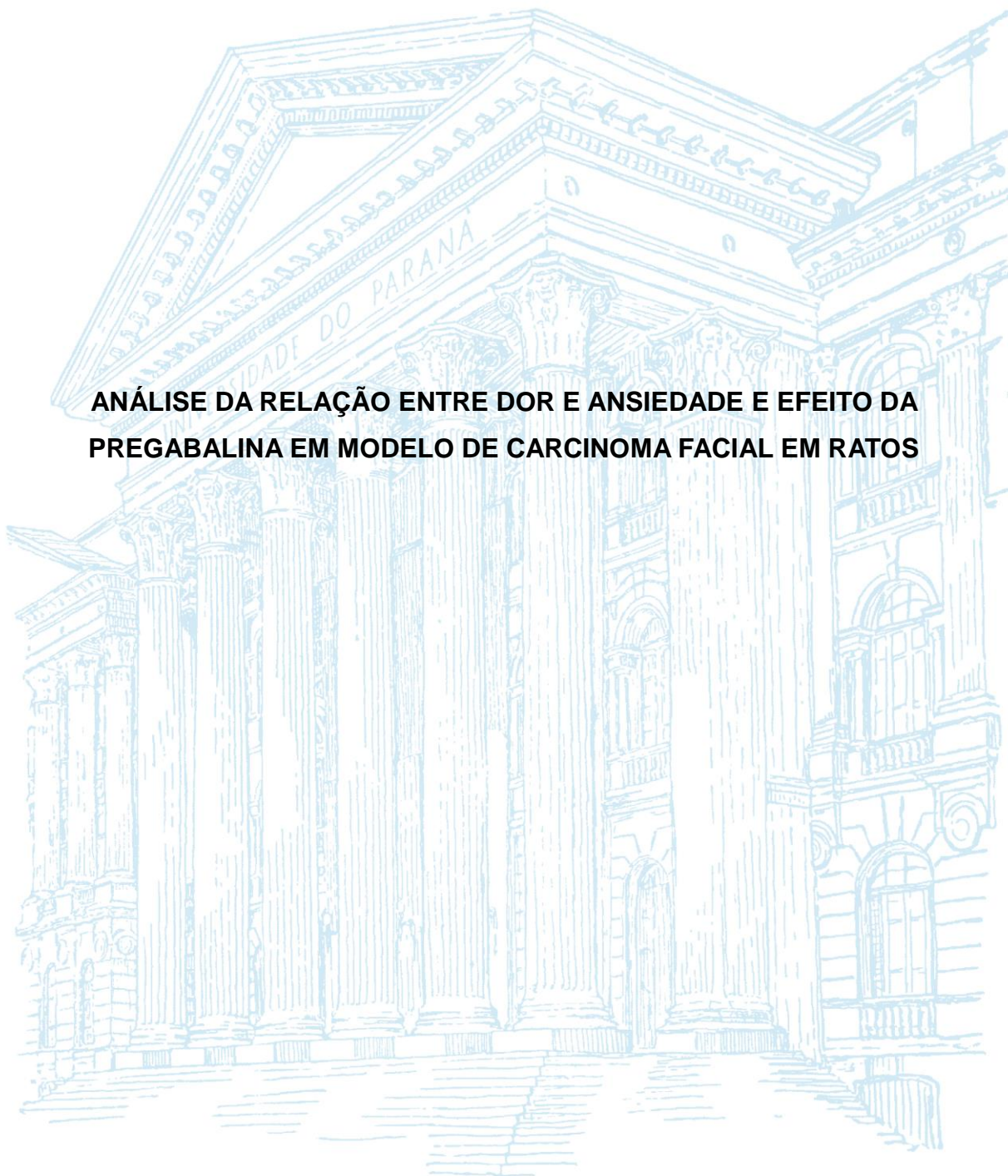


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

EDER GAMBETA DE ANDRADE

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DOR E ANSIEDADE E EFEITO DA
PREGABALINA EM MODELO DE CARCINOMA FACIAL EM RATOS**



CURITIBA

2017

EDER GAMBETA DE ANDRADE

**ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DOR E ANSIEDADE E EFEITO DA
PREGABALINA EM MODELO DE CARCINOMA FACIAL EM RATOS**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-graduação em Farmacologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Juliana Geremias Chichorro

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Janaina Menezes Zanoveli

CURITIBA

2017



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação FARMACOLOGIA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em FARMACOLOGIA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **EDER GAMBETA DE ANDRADE** intitulada: **ANÁLISE DA RELAÇÃO ENTRE DOR E ANSIEDADE E EFEITO DA PREGABALINA EM MODELO DE CARCINOMA FACIAL EM RATOS**, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.


Curitiba, 24 de Julho de 2017.


JULIANA GEREMIAS CHICHORRO

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)


LUANA FISCHER

Avaliador Externo (UFPR)


BRUNO JACSON MARTYNHAK

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

A minha querida mãe Sonia pelo amor incondicional, apoio, paciência e carinho durante mais uma etapa importante da minha vida.

A minha orientadora Prof^a Dr^a Juliana Geremias Chichorro por sempre me incentivar a estudar e buscar mais, por sempre estar disposta a me ajudar e ouvir minhas ideias mirabolantes, pela grande amizade, pela valiosa e incrível orientação, e principalmente por toda ajuda no meu amadurecimento.

A Prof^a Dr^a Janaína Menezes Zanoveli pela excelente co-orientação, pelas importantes sugestões, e grande amizade.

As Doutoras Caroline Machado Kopruszinski e Renata Cristiane dos Reis pela incrível amizade, paciência, carinho, brincadeiras e toda ajuda durante toda a realização deste trabalho. Mais uma vez eu estaria completamente perdido sem vocês.

Aos membros da banca examinadora pela cuidadosa leitura e sugestão ao estudo.

Aos Professores do Departamento de Farmacologia, especialmente a Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha por todo ensinamento e por ter contribuído para minha formação.

Aos colegas do Lab Dor pela companhia, ajuda e boa convivência.

A minha colega de laboratório e aniversário Helen de Moraes, pelo carinho, atenção e por todos os ensinamentos iniciais.

Aos queridos colegas de departamento: Ana Paula Waltrick, Bruna da Luz, Janiana de Oliveria, Jorge Dallazen, e Taysa Bassani, pelos momentos de descontração, boas risadas, e principalmente pelos intervalos do cafezinho.

Ao meu querido irmão Eric por toda ajuda, carinho, atenção e troca de cepilho feita.

Aos meus amados cãezinhos Lupi e Meg, por toda diversão e descontração.

As minhas queridas primas Cibele e Isabella pela amizade e por sempre acreditarem em mim.

A minha querida amiga Lusine Gomtsian pelo acolhimento, boas risadas e grandes ensinamentos.

Aos meus amigos Eduardo Ronchi, Carlos Matuella e Joaquim Picanço pelos momentos de descontração, jogatinas de Pokémon, e discussões sobre RuPaul.

E agradeço a todos os ratos utilizados para este estudo, pois sem eles nada disso seria possível.

“...and if I fly or if I fall
Least I can say I gave it all...”

RuPaul – Sissy That Walk

RESUMO

Dor e ansiedade são sintomas frequentes em pacientes com câncer de cabeça e pescoço. O anticonvulsivante pregabalina possui indicação terapêutica para o tratamento da dor e, embora já tenha sido observado em estudos pré-clínicos e clínicos que o tratamento com a pregabalina apresenta efeito ansiolítico, não há estudos onde foi avaliado o efeito do tratamento com pregabalina na ansiedade relacionada à dor no câncer, mais especificamente câncer orofacial. Assim, o objetivo desse estudo foi investigar a relação entre dor e ansiedade em ratos com carcinoma facial, bem como avaliar a influência do tratamento com pregabalina nesses dois aspectos. O carcinoma facial foi induzido pela inoculação de células tumorais Walker-256 na área direita de inserção das vibrissas em ratos machos. A hiperalgesia mecânica facial e o comportamento do tipo ansioso foram avaliados no terceiro e sexto dias após a inoculação das células tumorais através dos filamentos de Von Frey (VF), e pelos testes do labirinto em cruz elevado (LCE) e transição claro-escuro (TCE), respectivamente. Foi avaliado no sexto dia o comportamento de *grooming* espontâneo facial e o teste de preferência condicionado ao lugar (CPP) como medidas de dor não evocadas. O efeito do tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) foi avaliado no sexto dia após a inoculação das células tumorais nos testes do VF, LCE, TCE, campo aberto, *grooming* espontâneo e CPP. Nossos resultados demonstraram que os animais com tumor desenvolvem hiperalgesia mecânica facial no terceiro dia, e esta se manteve até o sexto dia, entretanto o comportamento do tipo ansioso só foi detectado no sexto dia e apenas nos animais hiperalgésicos. O tratamento com pregabalina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica facial e o comportamento do tipo ansioso no grupo tumor no sexto dia após a inoculação das células tumorais. Ademais, o tratamento foi capaz de reduzir o *grooming* facial espontâneo e de induzir CPP seis dias após a inoculação das células tumorais. Todas essas alterações comportamentais foram específicas ao tratamento, uma vez que não foi observado alteração na atividade locomotora dos animais. Tendo em vista que o comportamento do tipo ansioso foi detectado após o estabelecimento das alterações sensoriais na face e, em apenas nos animais com tumor hiperalgésicos, nossos dados sugerem que a ansiedade é posterior ao desenvolvimento da dor e que a pregabalina pode representar uma opção terapêutica promissora no tratamento da dor e ansiedade associadas ao câncer na região orofacial.

Palavras-chave: hiperalgesia mecânica, dor espontânea, câncer orofacial, anticonvulsivante, pregabalina, ratos.

ABSTRACT

Pain and anxiety are frequent symptoms in head and neck cancer patients. The anticonvulsant pregabalin has a therapeutic indication for the treatment of pain and, although pre-clinical and clinical studies have shown that treatment with pregabalin has an anxiolytic effect, there are no studies evaluating the effect of pregabalin treatment on anxiety related to cancer pain, more specifically orofacial cancer. Thus, the aim of this study was to investigate the relationship between pain and anxiety in rats with facial carcinoma, as the influence of pregabalin treatment in both aspects. The facial carcinoma was induced by subcutaneous inoculation of Walker-256 tumor cells in the right vibrissa pad of male Wistar rats. The facial mechanical hyperalgesia and anxiety-like behavior was assessed on day 3 and 6 post tumor inoculation, using Von Frey filaments (VF), elevated plus maze (EPM) and light-dark transition (LDT) tests, respectively. Spontaneous facial grooming and conditioned place preference (CPP) were assessed as non-evoked pain measurements 6 days after tumor cells inoculation. The effect of pregabalin treatment (30 mg/kg, p.o.) was evaluated on day 6 post tumor cells inoculation on VF, EPM, LDT, open field, spontaneous grooming, and CPP tests. Our results demonstrated that tumor-bearing rats developed facial mechanical hyperalgesia starting 3 days post tumor induction, which was also significant on day 6, but the anxiety-like behavior was detected only in hyperalgesic tumor-bearing rats and only six days after tumor cells inoculation. Pregabalin treatment reduced both facial mechanical hyperalgesia and the anxiety-like behavior in tumor group on day 6 post tumor inoculation. In addition, pregabalin treatment was able to reduce the spontaneous facial grooming and to induce CPP 6 days after tumor inoculation. All behavioral changes were specific to treatment, since no alteration in the locomotor activity of the animals was observed. Considering that anxiety-like behavior was detected after the onset of facial sensorial alterations, and only in hyperalgesic tumor-bearing rats, our data suggest that anxiety is subsequent to the development of pain, and pregabalin may represent a promising therapeutic option for pain and anxiety control in orofacial cancer patients.

Keywords: Mechanical hyperalgesia, spontaneous pain, orofacial cancer, anticonvulsant, pregabalin, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Escadas analgésicas para o controle da dor associada ao câncer.	24
Figura 2 Linha temporal dos protocolos experimentais.	34
Figura 3 Avaliação comportamental no terceiro dia após a inoculação facial das células tumorais.	37
Figura 4 Avaliação comportamental no sexto dia após a inoculação facial das células tumorais.....	38
Figura 5 Tratamento sistêmico agudo com pregabalina atenuou a hiperalgesia mecânica facial induzida pelo tumor.....	39
Figura 6 Tratamento sistêmico agudo com pregabalina reduziu o comportamento do tipo ansioso nos animais tumor que desenvolveram hiperalgesia mecânica facial. ...	41
Figura 7 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na dor não evocada associada ao câncer facial.	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Avaliação da atividade locomotora espontânea.....	38
Tabela 2 Efeito do tratamento sistêmico agudo com pregabalina na atividade locomotora espontânea.....	41
Tabela 3 Avaliação comportamental em ratos com tumor facial e influência do tratamento com pregabalina.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ACC	Córtex Cingulado Anterior (<i>Anterior Cingulate Cortex</i>)
AINÉ	Anti-Inflamatório Não Esteroidal
AMPA	Ácido A-Amino-3-Hidroxi-Metil-5-4-Isoxazolpropiónico
ANOVA	Análise De Variância
APA	<i>American Psychiatric Association</i>
BDNF	Fator De Crescimento Derivado Do Cérebro (<i>Brain Derived Neurotrophic Factor</i>)
BLA	Núcleo Basolateral Da Amígdala
BNST	Núcleo Intersticial Da Estria Terminal (<i>Bed Nucleus of the Stria Terminalis</i>)
CCI	Constricção Crônica do Nervo Ciático
CeA	Núcleo Central Da Amígdala
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freund (<i>Complete Freund's Adjuvant</i>)
CGRP	Peptídeo Relacionado Ao Gene Da Calcitonina (<i>Calcitonin Gene Related Peptide</i>)
CION	Constricção do Nervo Infraorbital
CPP	Preferência Condicionada ao Lugar (<i>Conditioned Place Preference</i>)
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EPM	Erro Padrão Da Média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GABA	Ácido Gama Aminobutírico
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HPV	Papilomavírus Humano (<i>Human Papiloma Virus</i>)
i.p.	Intraperitoneal
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
IC	Córtex Insular (<i>Insular Cortex</i>)
INCA	Instituto Nacional Do Câncer
ISRS	Inibidor Seletivo Da Recepção De Serotonina
Kg	Quilograma

LCE	Labirinto Em Cruz Elevado
LTP	Potenciação De Longo Prazo (<i>Long Term Potentiation</i>)
mL	Mililitro
mPFC	Córtex Pré-Frontal Medial
NGF	Fator De Crescimento Do Nervo (<i>Nerve Growth Factor</i>)
OMS	Organização Mundial Da Saúde
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal (<i>Periaqueductal Gray</i>)
PBS	Tampão Salina-Fosfato
PEAP	Paradigma de Fuga/Esquiva de Lugar (<i>Place escape/avoidance Paradigm</i>)
PGB	Pregabalina
PNL	Ligação Parcial do Nervo
RVM	Bulbo Rostroventromedial (<i>Rostral Ventromedial Medulla</i>)
SCI	Lesão no Cordão Espinhal
SP	Substância P
TAG	Transtorno De Ansiedade Generalizada
TCE	Transição Claro-Escuro
TEPT	Transtorno De Estresse Pós-Traumático
TP	Transtorno Do Pânico
TS	Transtorno Social
v.o.	Via Oral
VF	Von Frey
VGCC	Canal de Cálcio Dependente de Voltagem (<i>Voltage Gated Calcium Channel</i>)
vHPC	Hipocampo Ventral
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	13
1.2 DOR ASSOCIADA AO CÂNCER	14
1.2.1 Processamento nociceptivo trigeminal	14
1.2.2 Dor relacionada ao câncer de cabeça e pescoço	16
1.3 ANSIEDADE PATOLÓGICA: UMA EMOÇÃO MAL ADAPTATIVA.....	18
1.3.1 Ansiedade patológica e câncer.....	19
1.4 A RELAÇÃO ENTRE DOR E ANSIEDADE	20
1.5 CONTROLE DA DOR E DA ANSIEDADE ASSOCIADA AO CÂNCER	22
1.6 PREGABALINA	25
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 ANIMAIS	28
3.2 DROGAS	28
3.3 MANUTENÇÃO E INOCULAÇÕES DAS CÉLULAS TUMORAIS.....	29
3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS	30
3.4.1 Hiperálgia mecânica facial.....	30
3.4.2 Labirinto em cruz elevado	30
3.4.3 Transição claro-escuro	31
3.4.4 Campo aberto	31
3.4.5 <i>Grooming</i> espontâneo	32
3.4.6 Preferência condicionada ao lugar	32
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	33
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
4 RESULTADOS.....	36
4.1 Avaliação temporal do comportamento do tipo ansioso em ratos com carcinoma facial.....	36
4.2 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na hiperálgia mecânica associada ao carcinoma facial.....	39
4.3 Tratamento com pregabalina apresentou efeito do tipo ansiolítico nos animais	

com carcinoma facial	40
4.4 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na dor não evocada associada ao carcinoma facial	42
5 DISCUSSÃO	43
5.1 Relação entre a nocicepção e o comportamento do tipo ansioso.....	43
5.2 Efeito da pregabalina na nocicepção evocada	45
5.3 Efeito do tipo ansiolítico da pregabalina	46
5.4 Efeito da pregabalina na dor não evocada	48
6 CONCLUSÃO.....	52
REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

As neoplasias de cabeça e pescoço são o sexto tipo de câncer mais frequente mundialmente, com mais de 600 mil novos casos diagnosticados por ano e com aproximadamente 350 mil óbitos (DIXIT *et al.*, 2015). Essas neoplasias incluem cânceres que são originados na cavidade oral e nasal, seios paranasais, glândulas salivares, faringe e laringe, podendo ocorrer metástase para diferentes locais (REZENDE *et al.*, 2010; CAMPANA e GOIATO, 2013). Cerca de 80% das neoplasias de cabeça e pescoço são cânceres na cavidade oral, os quais em sua maioria são diagnosticados como carcinoma oral de células escamosas (REZENDE *et al.*, 2010; NCI, 2013). Para o Brasil, o INCA estima a ocorrência de aproximadamente 11.140 novos casos de câncer em homens e 4.350 em mulheres, para o ano de 2016, sendo que estas estimativas referem-se apenas ao câncer que afeta o lábio e a cavidade oral (INCA, 2016).

A patogênese da doença inclui tanto fatores extrínsecos, quanto intrínsecos ao organismo. Dentro os fatores extrínsecos, o uso abusivo de álcool e tabaco são os mais importantes para o desenvolvimento da doença, especialmente para o câncer da cavidade oral, sendo que o uso concomitante dos dois aumenta consideravelmente o risco de desenvolvimento (HASHIBE *et al.*, 2009; NCI, 2013). Além disso, infecções pelo papilomavírus humano (HPV) é outro fator de risco para o desenvolvimento de neoplasias de cabeça e pescoço, principalmente na região da orofaringe (CHATURVEDI *et al.*, 2011; NCI, 2013). Considerando os fatores intrínsecos, alterações genéticas, tais como na expressão de diversos microRNA que atua como potentes oncogênes ou supressores do tumor, representam o principal fator para o desenvolvimento dessa neoplasia (KARATAS *et al.*, 2017).

O melhor método diagnóstico para este tipo de câncer é através de exames clínicos, nos quais são avaliadas as características das lesões, tais como ulceração, infiltração e necrose tecidual, além de exames por imagem. Para a confirmação do diagnóstico a realização de biópsias e análises histopatológicas são empregadas (BAGAN *et al.*, 2010; INCA, 2012). Após confirmação do diagnóstico da doença, o tratamento dependerá de uma série de fatores, incluindo a localização do tumor, o

estágio da doença, a idade do paciente, bem como a saúde geral do paciente. Os principais métodos de tratamento incluem cirurgias, radioterapia, quimioterapia ou a combinação desses tratamentos (INCA, 2012).

É importante ressaltar que a dor é um dos sintomas chave para o diagnóstico precoce da doença, sendo freqüente em vários tipos de câncer de cabeça e pescoço (BAGAN *et al.*, 2010; LAM e SCHMIDT, 2011). Além da dor, outros sintomas associados a esta condição são nódulos, feridas não cicatrizadas, dor de garganta persistente, dificuldade para deglutir, além de alterações na voz. Entretanto, é importante ressaltar que esses sintomas podem estar associados a outras condições menos graves e de fácil tratamento.

1.2 DOR ASSOCIADA AO CÂNCER

1.2.1 Processamento nociceptivo trigeminal

As informações sensoriais da região craniofacial são transmitidas através do sistema sensorial trigeminal, o qual é constituído por estruturas periféricas, i.e., nervo e gânglio do trigêmeo, e estruturas centrais, i.e., núcleos do complexo sensorial trigeminal (SESSLE, 2006). O nervo trigêmeo é composto por três ramos: o ramo oftálmico, o ramo maxilar e o ramo mandibular. O ramo oftálmico inerva principalmente a parte superior da cabeça, incluindo as meninges e a córnea; o ramo maxilar inerva a mucosa e os dentes maxilares, o lábio superior, e o ramo mandibular inerva principalmente a região da mandíbula, lábio inferior, mucosa e dentes mandibulares. As fibras do ramo oftálmico e do ramo maxilar são apenas sensoriais, enquanto que junto com as fibras do ramo mandibular trafegam fibras motoras, as quais são responsáveis pela inervação dos músculos mastigatórios (SESSLE, 2006).

As fibras que integram o nervo trigêmeo são classificadas em fibras nociceptivas (fibras A δ e fibras C) e mecanoreceptores de baixo limiar (fibras A α e A β). Dentre as fibras nociceptivas, as fibras A δ são mielinizadas, com velocidade de condução e diâmetro intermediário, enquanto que as fibras C não são mielinizadas, apresentam velocidade de condução lenta e menor diâmetro, sendo que ambas são ativadas por estímulos nocivos mecânicos, térmicos e químicos. Em relação às fibras proprioceptivas, tanto as fibras A α quanto as fibras A β são mielinizadas com

velocidade de condução alta e de maior diâmetro, as quais são responsáveis pela transdução de estímulos proprioceptivos e inócuos (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Os corpos celulares destas fibras estão presentes no gânglio do trigêmeo, enquanto que os corpos celulares das fibras proprioceptivas ($A\alpha$) estão localizados no núcleo mesencefálico, e as mesmas estabelecem sinapses com neurônios de segunda ordem nos núcleos do complexo sensorial trigeminal, localizados no tronco encefálico. O complexo sensorial pode ser dividido em núcleo sensorial principal e núcleo do trato espinhal, sendo que o último é integrado pelos subnúcleo *oralis*, subnúcleo *interpolaris* e subnúcleo *caudalis*. O subnúcleo *caudalis*, também denominado corno dorsal bulbar, localiza-se no bulbo e recebe a maior parte das projeções dos aferentes nociceptivos. Os neurônios que partem destes subnúcleos, i.e., neurônios de segunda ordem, podem ser classificados como nociceptivos específicos, de amplo limiar dinâmico, e receptores mecânicos de baixo limiar. Os primeiros são ativados exclusivamente por estímulos nocivos, enquanto neurônios de ampla faixa dinâmica, por apresentarem essa ampla faixa de reconhecimento, podem responder desde estímulos inócuos até nocivos (SESSLE, 2005).

Os neurônios de segunda ordem redirecionarão as informações sensoriais para diferentes regiões do tálamo, estrutura responsável pelo processamento dos estímulos sensoriais. Do tálamo partem projeções de neurônios de terceira ordem para o córtex somatossensorial primário e secundário, e ínsula; regiões responsáveis pela interpretação das informações em caráter de localização, intensidade e duração. Ademais, as informações sensoriais provenientes do tálamo podem ser conduzidas para outras estruturas centrais corticais e límbicas, sendo nessas regiões que ocorrem o processamento e a interpretação das respostas emocionais, afetivas e cognitivas da dor (SESSLE, 2006; OSSIPOV *et al.*, 2010; CHICHORRO *et al.*, 2017).

Além disso, a ativação de estruturas mesencefálicas e bulbares podem modular o processamento nociceptivo. A principal via descendente inibitória, inclui estruturas como a substância cinzenta periaquedutal (PAG) – bulbo rostroventromedial (RVM), as quais emitem projeções para o corno dorsal da medula, modulando as respostas nociceptivas. Estudos identificaram que no RVM existe subtipo de células denominadas de células *on*, as quais apresentam um aumento na atividade em resposta a estímulos nocivos, e outro subtipo denominado de células *off*, sendo que essas possuem função de cessar o disparo nociceptivo

(OSSIPOV *et al.*, 2014; CHICHORRO *et al.*, 2017). Além disso, a PAG e o RVM possuem comunicação com o *locus coeruleus* e o núcleo subparabraquial, dos quais partem projeções noradrenérgicas descendentes até o complexo sensorial trigeminal e o corno dorsal da medula (PERTOVAARA, 2006; OSSIPOV *et al.*, 2014).

1.2.2 Dor relacionada ao câncer de cabeça e pescoço

Dentre os vários sintomas relacionados às neoplasias de cabeça e pescoço, a dor normalmente é o primeiro sintoma a ser relatado em cerca de 40% dos casos, sendo que cerca de 70% dos pacientes relatam dor no decurso da doença (LAM e SCHMIDT, 2011; SCHMIDT, 2014). Muitas das neoplasias de cabeça e pescoço são carcinomas de células escamosas, as quais são consideradas extremamente dolorosas (SCHMIDT, 2015). Nesse tipo de neoplasia, os mecanismos mais comuns de geração de dor são a estimulação direta dos terminais nervosos na mucosa, compressão dos nervos sensoriais, ulceração e infecção, invasão e destruição óssea e complicações da terapia oncológica (BONICA, 1990). A estimulação das terminações nervosas livres é um dos primeiros sinais do crescimento tumoral, podendo produzir dor superficial, causando uma sensação de queimação local constante (DATTA e PAI, 2006). Além disso, processos funcionais e estimulação mecânica das estruturas orais durante a fala, mastigação, deglutição podem desencadear dor severa (DATTA e PAI, 2006; VIET e SCHMIDT, 2012). Carcinomas de células escamosas tendem a produzir ulceração, e apesar da ulceração *per se* não produzir dor, o tecido ulcerado pode infeccionar, levando a inflamação, o que pode causar o processo doloroso (DATTA e PAI, 2006). Como o crescimento tumoral pode promover compressão do nervo trigêmeo, a dor normalmente é relatada na área de inervação do ramo do nervo envolvido. Inicialmente, a invasão óssea não produz dor, entretanto, com o crescimento tumoral ocorre uma expansão do periósteo, o que promove a estimulação dos aferentes nociceptivos dessa região (DATTA e PAI, 2006). Além disso, o paciente pode sentir dor devido a complicações ou sequelas do tratamento do tumor. Durante procedimentos cirúrgicos normalmente é necessário fazer a transecção dos nervos, o que pode levar a formação de neuromas. Mais ainda, o tratamento quimioterápico sozinho ou em combinação com radioterapia pode levar ao desenvolvimento de mucosite, a qual representa uma das principais complicações do tratamento quimioterápico (DATTA e PAI, 2006). A

mucosite é uma ulceração que pode ocorrer em todo o trato digestivo, sendo extremamente dolorosa quando acomete a cavidade oral (SONIS, 2013; VIET *et al.*, 2014).

A dor no câncer pode ser expressa na forma de dor evocada, dor espontânea ou tônica, e dor disruptiva (MANTYH, 2006). A dor evocada ocorre quando há a ativação direta das fibras aferentes primárias, podendo ser desencadeada por estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Muitos nociceptores tem suas propriedades de respostas alteradas após a lesão tecidual causada pelo tumor, promovendo o desenvolvimento da sensibilização periférica, o que resulta numa resposta aumentada a um estímulo nocivo (hiperalgesia), e a percepção de dor a um estímulo inócuo (alodinia) (MANTYH, 2006). Em relação à dor espontânea ou tônica, a mesma é percebida na ausência de qualquer estímulo, e como a dor possui um componente emocional e subjetivo, esse aspecto da dor pode estar intimamente relacionado com o componente motivacional e afetivo da dor (KING *et al.*, 2009; NAVRATILOVA *et al.*, 2013). Já a dor do tipo disruptiva, também conhecida por *breakthrough pain*, é comumente descrita como uma exacerbação transiente da dor que pode ocorrer de forma espontânea ou por algum gatilho específico previsível ou imprevisível, que ocorre na presença do controle farmacológico da dor preexistente (MERCADANTE, 2013, 2015). Estudos sugerem que apesar de existir essas três formas de dor no câncer os mecanismos subjacentes ao desenvolvimento de cada uma delas parecem ser distintos e ainda pouco conhecidos (QU *et al.*, 2011; NAVRATILOVA *et al.*, 2013; MERCADANTE, 2015)

A dor nessa patologia é mantida pela liberação de diversos mediadores nociceptivos no microambiente tumoral. Mais especificamente nas neoplasias de cabeça e pescoço, o NGF e as endotelinas parecem ser mediadores chaves na dor (VIET e SCHMIDT, 2012; SCHMIDT, 2015). Estudos com carcinoma oral de células escamosas demonstraram que o tumor produz diversos fatores neurotróficos, incluindo o NGF, sendo que o próprio tumor pode produzir e liberar NGF (YE *et al.*, 2011). Estudos pré-clínicos demonstraram que o sequestro do NGF com anticorpo promove o alívio da dor, e o anti-NGF reduz a dor, progressão e caquexia em modelo animal com carcinoma de células escamosas (MANTYH *et al.*, 2010; YE *et al.*, 2011). Ademais, carcinoma oral de células escamosas produz altos níveis de endotelina-1 (ET-1) (SCHMIDT *et al.*, 2007; PICKERING *et al.*, 2008). Corroborando essas evidências, um estudo prévio do nosso grupo mostrou a participação do

sistema endotelinérgico na dor em modelo de carcinoma facial, em que o bloqueio dos receptores de endotelina com a bosentana (antagonista misto ET_A e ET_B) foi capaz de reduzir a hiperalgesia ao calor e reduzir a dor espontânea (KOPRUSZINSKI, 2016).

O xenoenxerto com células Walker-256B tem sido amplamente utilizado para estudar a fisiopatologia do câncer, i.e., metabolismo celular, comprometimento imunológico, efeito de drogas antitumorais, além da dor associada ao câncer (ACCO *et al.*, 2012; SHENOY *et al.*, 2016). Devido a suas características histomorfológicas semelhantes ao carcinoma oral humano, de rápido crescimento, produção e liberação de citocinas, essa linhagem tumoral tem sido utilizada para o estudo dos mecanismos que contribuem para a dor em carcinomas orofaciais. Já foi demonstrado que após a inoculação das células Walker-256 na face os animais desenvolvem alterações sensoriais evocadas, e.g., hiperalgesia mecânica e térmica, e não evocadas, como *grooming* espontâneo e preferência condicionada ao lugar, em diferentes períodos, o que permite o estudo de diferentes aspectos da dor associada ao câncer (HARANO *et al.*, 2010; HIDAKA *et al.*, 2011; KOPRUSZINSKI, 2016; ONO *et al.*, 2009).

1.3 ANSIEDADE PATOLÓGICA: UMA EMOÇÃO MAL ADAPTATIVA

A ansiedade é um estado emocional que possui tanto componentes psicológicos, como apreensão, medo da perda do controle, sentimento de inutilidade, e componentes fisiológicos, tais como hiperexcitação autônoma, aumento da frequência cardíaca e respiração, tremor, sudorese, tensão muscular, dentre outros (APA, 2013). A ansiedade, enquanto uma emoção normal é adaptativa, ou seja, tem característica de sobrevivência ou de aumento de desempenho em diferentes atividades, aumentando a atenção e permitindo respostas rápidas a possíveis perigos. No entanto, quando este sentimento é persistente, de alta intensidade e duradouro ele perde essa característica adaptativa de sobrevivência e torna-se uma resposta emocional mal adaptativa, levando ao desenvolvimento de uma condição patológica denominada de transtornos de ansiedade.

Há vários tipos de transtornos de ansiedade com base em diferentes sinais e sintomas, dos quais podemos destacar o Transtorno de Ansiedade Generalizada

(TAG), Transtorno do Pânico (TP) com ou sem agorafobia e o Transtorno de Ansiedade Social (TAS). Esses transtornos são relativamente freqüentes na população em geral, com uma prevalência de aproximadamente de 30% (KESSLER, 2007). Existem evidências que os mecanismos centrais da ansiedade são similares em animais e humanos, e o que o processamento para as respostas são mediados parcialmente por substratos neurais que se sobrepõem (DAVIS *et al.*, 2010). Algumas das áreas já identificadas que estão implicadas na modulação da ansiedade são a amígdala (porções basolateral – BLA e central – CeA), o hipocampo, o córtex pré-frontal medial (mPFC) o hipotálamo e a substância cinzenta periaquedutal (PAG) (TOVOTE *et al.*, 2015; CRASKE *et al.*, 2017).

É importante ressaltar que algumas dessas estruturas são responsáveis tanto por mediar respostas ansiogênicas quanto ansiolíticas, indicando a presença de circuitos neurais distintos na ansiedade. CALHOON e TYE (2015) propuseram um modelo de quatro passos, onde primeiramente ocorre a detecção de estímulos externos, seguido da interpretação e avaliação do evento, que por fim gerará uma resposta frente ao estímulo. Na ansiedade, ocorre então a ativação de vias que irão interpretar o estímulo como ameaçador. Por exemplo, a ativação da via BLA – hipocampo ventrolateral (vHPC) – mPFC é considerada ansiogênica, enquanto que a ativação da via BLA – CeA subdivisão lateral pode ser tanto ansiolítica, quanto ansiogênica (TYE *et al.*, 2011; FELIX-ORTIZ *et al.*, 2013). Os eferentes da CeA para a PAG e hipotálamo são os responsáveis por iniciar as respostas relacionadas à ansiedade, respostas autônomas, e respostas hormonais (GRUPE e NITSCHKE, 2013). Levando em consideração que alguns dos substratos neurais implicados nos transtornos de ansiedade também estão relacionados com a dor, é possível que as conexões entre esses substratos participem de um mecanismo comum entre ansiedade e dor (ZHUO, 2016).

1.3.1 Ansiedade patológica e câncer

Pacientes com câncer enfrentam as incertezas da doença, que incluem preocupações com a eficácia do tratamento e seus efeitos, medo da progressão tumoral e morte (MEHNERT e KOCH, 2007). Os níveis de ansiedade tendem a aumentar durante a evolução da doença, sendo que o paciente relata preocupação e medo sobre o futuro (MASSIE e HOLLAND, 1992; MILLER e MASSIE, 2006).

Respostas persistentes de ansiedade e preocupação, ou seja, respostas mal adaptativas e patológicas estão presentes em pacientes com câncer, e essas respostas podem levar a transtornos de ansiedade (STEINMAN, 2009).

Existem evidências de que pacientes diagnosticados com câncer apresentam alta incidência de TAG (DEROGATIS *et al.*, 1983; NORDIN *et al.*, 2001). A prevalência de TAG pode chegar até 49% em pacientes com câncer, sendo que aqueles que já tiveram histórico de ansiedade antes do diagnóstico de câncer possuem maior risco de reincidência (BREITBART, 1995; VAN'T SPIJKER *et al.*, 1997; NIKBAKHSH *et al.*, 2014). O nível de ansiedade pode diminuir quando o paciente faz reavaliação do caso, resultando em um prognóstico favorável. Por outro lado, em pacientes que são reavaliados e o prognóstico é ruim, os níveis de ansiedade aumentam na maioria dos casos (LAMPIC *et al.*, 2001).

Sabe-se que tanto o diagnóstico quanto o tratamento do câncer podem prejudicar o estado psicossocial do paciente, de tal modo a afetar a qualidade de vida negativamente (MELO FILHO *et al.*, 2013). Em relação aos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, cerca de 30% desses pacientes apresentam níveis elevados de ansiedade (WU *et al.*, 2016). Apesar da relação entre ansiedade e câncer não estar completamente elucidada, alguns estudos sugerem que vários fatores incluindo a doença *per se*, o tratamento com antineoplásicos, o medo do prognóstico e o controle insatisfatório da dor associada ao câncer podem contribuir para o aumento dos níveis de ansiedade (MASSIE e HOLLAND, 1989; TICKOO *et al.*, 2015; UNAL *et al.*, 2016). Além dessas evidências clínicas, dados prévios do nosso laboratório já demonstraram que animais com carcinoma orofacial desenvolver hiperalgesia térmica ao calor e comportamento do tipo ansioso, demonstrando uma possível relação entre a dor associada ao câncer facial e ansiedade (GAMBETA *et al.*, 2016).

1.4 A RELAÇÃO ENTRE DOR E ANSIEDADE

A interação entre dor e emoções negativas (ansiedade, medo, depressão) já foi reportada em inúmeros estudos. Pacientes com fibromialgia apresentam maior sensação de dor quando estão com raiva ou tristes (VAN MIDDENDORP *et al.*, 2010). Pacientes diagnosticados com transtorno de estresse pós-traumático (TEPT)

descrevem um aumento na sensação de dor (GEUZE *et al.*, 2007). Sabe-se ainda que a dor pode causar alterações emocionais, como ansiedade e medo, assim como a ansiedade pode aumentar a sensação de dor (BUSHNELL *et al.*, 2013; KOGA *et al.*, 2015). Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos subjacentes a essa interação, mas é válido ressaltar que técnicas ou manipulações que reduzem a ansiedade, bem como o uso de drogas ansiolíticas são benéficas em reduzir a dor em pacientes com dor crônica (WIECH e TRACEY, 2009).

Recentemente, através de estudos de imagem do cérebro de humanos foi possível identificar várias regiões encefálicas que estão envolvidas em ambas as condições, das quais pode ser destacado o córtex insular (IC), o córtex cingulado anterior (ACC) e a amígdala (ZHUO, 2016). Considerando as limitações dos modelos animais, os estudos de imagem do cérebro humano forneceram um suporte para o entendimento dessa interação entre a dor e a ansiedade, e esses estudos tem apontado o ACC como uma das regiões mais importantes para essa interação (HSIEH *et al.*, 1999; PLOGHAUS *et al.*, 1999; WIECH e TRACEY, 2009; YOSHINO *et al.*, 2010).

O ACC é considerado importante em integrar as informações de ansiedade e dor pelo fato das sinapses glutamatérgicas nessa estrutura serem altamente plásticas, sendo semelhantes às encontradas no hipocampo que foram bem descritas no aprendizado e memória (BLISS e COLLINGRIDGE, 1993, 2013). ZHUO (2016) propôs uma via descendente corticoespinhal que pode explicar a dor ou desconforto somático relacionado à ansiedade. Segundo esse autor, o aumento da atividade do ACC devido ao aumento dos níveis de ansiedade poderia ativar o sistema facilitatório descendente. Neurônios no ACC mandam projeções para o RVM, o qual possui projeções modulatórias para o corno dorsal da medula espinhal. Além disso, neurônios do ACC também podem fazer conexões diretamente com o corno dorsal da medula através de uma via corticoespinhal, sendo o glutamato o provável transmissor liberado. Essas vias descendentes podem potencializar a transmissão excitatória de neurônios sensoriais espinhais e aumentar a transmissão para estruturas superiores através da via espinotalâmica. Tendo isso em vista, a rede ACC-espinhal pode promover um possível mecanismo para a ansiedade desencadear a dor.

Corroborando as observações clínicas, estudos pré-clínicos já demonstraram uma relação entre dor e ansiedade. Estudos com modelo de

neuralgia pós-herpética, dor neuropática espinhal pela constrição do nervo ciático, dor neuropática associada ao HIV, demonstraram que os animais desenvolvem, além dos comportamentos nociceptivos, comportamento do tipo ansioso (HASNIE *et al.*, 2007; ROESKA *et al.*, 2008; WALLACE *et al.*, 2008; SEMINOWICZ *et al.*, 2009). Esta relação também já foi observada em alguns estudos em modelos animais de dor orofacial, os quais empregaram modelos de dor inflamatória, neuropática e dor associada ao câncer (SHANG *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015; BAHAAADDINI *et al.*, 2016; GAMBETA *et al.*, 2016; RAOOF *et al.*, 2016). Todavia nenhum estudo até o presente momento avaliou se haveria uma relação causal da ansiedade e da dor associada ao câncer, mais especificamente do câncer orofacial.

1.5 CONTROLE DA DOR E DA ANSIEDADE ASSOCIADA AO CÂNCER

Atualmente o tratamento farmacológico para o controle da dor em pacientes com câncer segue a Escada Analgésica para a Dor de Câncer proposta pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO, 1996). Essa escada é composta de três degraus, sendo que no primeiro degrau estão representados os anti-inflamatórios não esteroidais, no segundo os opióides fracos e no terceiro os opióides fortes. De acordo com essa escada, em casos de dor de intensidade leve recomenda-se o emprego dos fármacos do primeiro degrau. Em casos de dor de intensidade moderada, preconiza-se a utilização de opióides fracos com ou sem a associação de fármacos adjuvantes, e.g. antidepressivos, anticonvulsivantes. Quando a dor relatada é de intensidade severa sugerem a utilização de opióides fortes, com ou sem a associação de fármacos adjuvantes (Figura 1A) (WHO, 1996).

Entretanto, EISENBERG *et al.* (2005) relatam que aproximadamente 30% dos pacientes que recebem tratamento de acordo com a escada analgésica proposta pela OMS não alcançam uma analgesia efetiva. Tendo isto em vista, VARGAS-SCHAFFER (2010) propôs uma modificação da escada analgésica da OMS, incluindo um “quarto degrau”, no qual seriam empregados procedimentos intervencionistas, tais como bloqueio de nervos, estimuladores espinais, procedimentos cirúrgicos, a fim de buscar melhor alívio da dor severa (Figura 1B). Além disso, nessa modificação propõe-se que fármacos adjuvantes poderiam ser associados a qualquer momento de acordo com a necessidade do paciente. É

Interessante notar que essa versão da escada analgésica possui um design bidirecional, isto é, uma subida lenta para o controle de dor crônica e dor de câncer, e uma descida rápida para o controle de dor aguda intensa, dor crônica não controlada, e dor disruptiva. Por outro lado, RAFFA e PERGOLIZZI (2014) propuseram ao invés de uma escada, uma “pirâmide analgésica”, que segue as mesmas diretrizes propostas pela OMS; entretanto, sugere que no mesmo nível seja possível alternar os fármacos utilizados naquele nível. Por exemplo, alternar diferentes AINEs no primeiro nível, ou realizar uma rotação de opióides no 2º ou 3º níveis, ou procedimentos intervencionistas no topo. Além disso, é proposto também que a associação com fármacos adjuvantes pode ser utilizada em todos os níveis (Figura 1C).

Diferentes classes de fármacos com outras indicações terapêuticas são indicados para a utilização em associação com analgésicos para o controle da dor, os quais são chamados de adjuvantes. As principais classes de adjuvantes para o controle da dor são os anticonvulsivantes e os antidepressivos. Estes fármacos são recomendados para o controle da dor no câncer quando ocorre lesão dos aferentes sensoriais primários, caracterizando a dor neuropática associada ao câncer (MITRA e JONES, 2012; VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN *et al.*, 2017). Apesar dos opióides serem a droga de escolha para o controle da dor associada ao câncer, quando esta adquire o componente neuropático, a eficácia dos opióides é reduzida, mesmo em doses geralmente eficazes (PORTENOY *et al.*, 1990; HEGARTY e PORTENOY, 1994; MERCADANTE e PORTENOY, 2001). Além da baixa eficácia no controle da dor neuropática, o uso crônico de opióides produz diversos efeitos adversos (DWORKIN *et al.*, 2007). Devido a essas características, é recomendada a associação com os fármacos adjuvantes para um melhor controle da dor associada ao câncer.

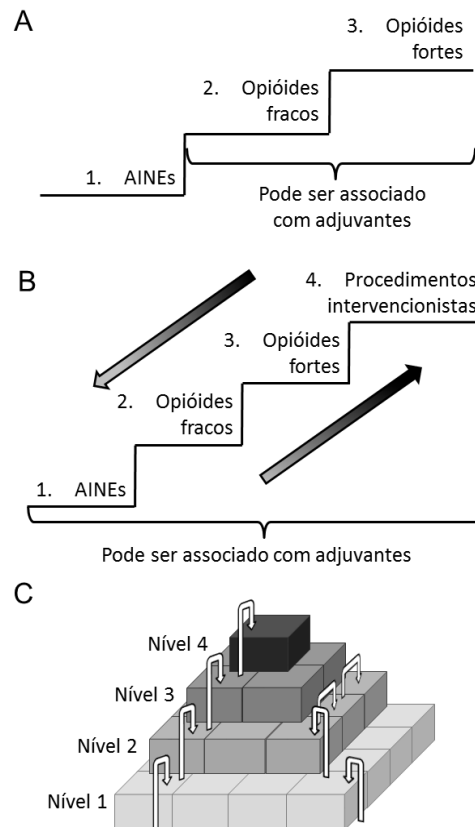


Figura 1 Escadas analgésicas para o controle da dor associada ao câncer.

Primeira escada proposta para o controle da dor associada ao câncer pela OMS (Painel A), Modificação proposta por Vargas-Schaffer em 2010 (Painel B), Pirâmide analgésica proposta por Raffa e Pergolizzi em 2014 (Painel C).

Com relação à ansiedade, existem evidências de que esse transtorno é subdiagnosticado e subtratado em pacientes com câncer. É interessante notar que o tratamento da ansiedade nessa população de pacientes normalmente é feito através de terapia cognitiva-comportamental (GREER *et al.*, 2010), ou com o uso de fármacos antidepressivos e/ou ansiolíticos (TRAEGER *et al.*, 2012). Atualmente há uma grande variedade de fármacos que possuem efeito ansiolítico e são usados no tratamento da ansiedade, tais como fármacos benzodiazepínicos e não benzodiazepínicos, os antidepressivos e também os anticonvulsivantes (ANDREATINI *et al.*, 2001). Os antidepressivos inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), tais como fluoxetina e paroxetina, são normalmente prescritos para o tratamento prolongado da ansiedade. Mais recentemente, alguns estudos evidenciaram que o tratamento com o anticonvulsivante pregabalina apresenta eficácia clínica no controle da dor, mas também pode melhorar a qualidade de vida do paciente com dor crônica, inclusive pelo seu efeito na ansiedade (FRAMPTON e FOSTER, 2006; WIFFEN *et al.*, 2013; FRAMPTON, 2014; JAVED *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

1.6 PREGABALINA

A pregabalina é um anticonvulsivante aprovado para o tratamento de crises epiléticas parciais (convulsões) em adultos e para a dor neuropática diabética, neuralgia pós-herpética, fibromialgia e dor neuropática associada à lesão da medula espinhal (FDA, 2004). Mais ainda, a pregabalina tem sido estudada para outras indicações ainda não aprovadas pelo FDA. Foi demonstrado que o tratamento com pregabalina foi capaz de melhorar a qualidade do sono, reduzir a síndrome das pernas inquietas, e auxiliar no tratamento do transtorno de ansiedade generalizada (HINDMARCH *et al.*, 2005; GARCIA-BORREGUERO *et al.*, 2010; MONTGOMERY e KASPER, 2010). As principais reações adversas mais frequentes já notificadas são tontura e sonolência, em geral de intensidade leve a moderada. A pregabalina apresenta estrutura molecular semelhante com a leucina e o GABA, entretanto não tem ligação relevante ao receptor de GABA, aos seus sítios alostéricos, ao transportador ou nas enzimas envolvidas em sua síntese e degradação (LI *et al.*, 2011; MICÓ e PRIETO, 2012).

A pregabalina liga-se na subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem, impedindo o influxo de cálcio de tal modo a reduzir a liberação de neurotransmissores excitatórios (KAVOUSSI, 2006; TESFAYE *et al.*, 2011). O canal de cálcio é formado por um complexo de subunidades: $\alpha 1$, $\alpha 2\delta$, β , e γ . A subunidade $\alpha 1$ é responsável por formar o poro para a passagem dos íons cálcio, e as outras subunidades são responsáveis pelo funcionamento e modulação do canal (DOLPHIN, 2006). Já foi demonstrando que a subunidade $\alpha 2\delta$ está presente nos canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo L, N, P/Q e R, os quais são ativados por alta voltagem, e no tipo T que é ativado por baixa voltagem. Sabe-se que esses subtipos de canais de alta e baixa voltagem compreendem um total de dez diferentes subunidades $\text{Ca}_v\alpha 1$. Três dessas subunidades abrangem a família do canal do tipo T, $\text{Ca}_v3.1$, $\text{Ca}_v3.2$ e $\text{Ca}_v3.3$. Há duas grandes famílias dos canais ativados por alta voltagem, a família Ca_v1 que codifica quatro diferentes tipos de canais do tipo L ($\text{Ca}_v1.1$ a $\text{Ca}_v1.4$), e a família Ca_v2 , que compreende o canal do tipo P/Q ($\text{Ca}_v2.1$), canal do tipo N ($\text{Ca}_v2.2$), e canal do tipo R ($\text{Ca}_v2.3$) (ZAMPONI, 2016). É interessante notar que o canal do tipo N apresenta papel importante para o desenvolvimento dos transtornos de ansiedade, bem como para a dor crônica (ZAMPONI, 2016). Mais ainda, a subunidade $\alpha 2\delta$ possui uma densa expressão em

várias regiões do sistema nervoso central, como o ACC, IC, amígdala, PAG e corno dorsal da medula (STAHL *et al.*, 2013). A pregabalina inibe a transmissão sináptica mediada principalmente pelo canal $\text{Ca}_v2.2$, além de interferir com a função da subunidade $\alpha 2\delta$ que é responsável pelo ancoramento do canal na membrana plasmática (STAHL *et al.*, 2013; ZAMPONI, 2016).

Após a despolarização da membrana plasmática, o aumento do influxo de íons cálcio pelos canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC) promove a liberação de mensageiros excitatórios, os quais possuem papel fundamental na transmissão nociceptiva. Tendo isso em vista, drogas que diminuam a transmissão sináptica através dos VGCC, como os gabapentinóides, representam um alvo farmacológico para o controle da dor. Os gabapentinóides são preferencialmente ativos em estados de sensibilização central, sendo que a subunidade $\alpha 2\delta$ é altamente expressa no corno dorsal da medula espinhal (TUCHMAN *et al.*, 2010). Estudos sugerem que a pregabalina pode reduzir as respostas nociceptivas a nível espinhal e supraespinhal (KREMER *et al.*, 2016).

Estudos clínicos já demonstraram a eficácia analgésica do tratamento com a pregabalina em pacientes com dor neuropática (PEREZ *et al.*, 2009; NAVARRO *et al.*, 2010). Mais especificamente em dores orofaciais, foi observado um efeito anti-hiperalgésico da administração sistêmica de pregabalina em modelo de dor neuropática trigeminal, dor neuropática diabética, dor inflamatória e dor associada ao câncer (CAO *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2013; NONES *et al.*, 2013; HUMMIG *et al.*, 2014). Embora já tenha sido observado em estudos pré-clínicos e clínicos que o tratamento com a pregabalina apresenta efeito ansiolítico em modelos de medo condicionado e em pacientes com transtorno de ansiedade generalizada, não há estudos nos quais se avaliaram o efeito do tratamento com pregabalina na ansiedade relacionada à dor no câncer (ZOHAR *et al.*, 2008; FELTNER *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o desenvolvimento concomitante de alterações comportamentais sensoriais e comportamento do tipo ansioso em ratos com tumor facial, bem como verificar o potencial efeito antinociceptivo e ansiolítico da pregabalina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Após a inoculação das células tumorais em ratos, foi avaliado:

- O decurso temporal do comportamento do tipo ansioso;
- A relação entre o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica facial e o comportamento do tipo ansioso;
- A influência do tratamento sistêmico agudo com pregabalina na hiperalgesia mecânica facial;
- O efeito do tratamento sistêmico agudo com pregabalina no comportamento do tipo ansioso em ratos hiperalgésicos;
- A influência do tratamento sistêmico agudo com pregabalina na atividade locomotora;
- O efeito do tratamento sistêmico agudo com pregabalina na dor não evocada associada ao tumor facial.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Em todos os experimentos comportamentais foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, pesando entre 180-220 g. Para a manutenção das células tumorais, foram utilizadas ratas fêmeas (*Rattus norvegicus*), variedade Wistar, pesando entre 180-200 g. Todos os animais foram provenientes do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a ração e água. Os animais foram aclimatizados no biotério por no mínimo dois dias antes dos experimentos. Foram mantidos e agrupados em um número máximo de 5 animais por caixa. Os experimentos foram conduzidos de acordo com o guia de ética da Associação Internacional para o estudo da Dor (IASP) (ZIMMERMANN, 1983), e pelos regulamentos brasileiros para o bem-estar animal e Resoluções Normativas e Diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Todos os protocolos experimentais foram aprovados previamente pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal do Paraná (número de autorização # 938), e todos os esforços foram feitos para minimizar o número de animais e seu sofrimento.

3.2 DROGAS

Foram utilizadas as seguintes drogas, reagente e soluções no presente estudo:

- Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediaminetetraaceticacid* – EDTA, Amresco LLC, Cleveland, OH, USA);
- Azul de Tripán (Alphatec, Macaé, RJ, Brasil);
- Carboximetilcelulose (Geremias Farmácias, Videira, SC, Brasil);
- Cloridrato de Cetamina (Vetica Laboratórios de Produtos Veterinários, São Paulo, Brazil);

- Pregabalina (Lyrica®, Pfizer, Freiburg, Germany);
- Solução salina estéril 0,9% (Samtec biotecnológica, Ribeirão Preto, SP, Brasil);
- Tampão salina-fosfato (*Phosphatebuffered saline* – PBS, Laorclin, Vargem Grande, PR, Brasil);
- Xilasina (Rhobifarma Ind. Farmacêutica, São Paulo, Brazil);

A pregabalina foi preparada na forma de suspensão contendo 0,5% de carboximetilcelulose, sendo administrada na dose de 30 mg/kg por via oral (2 mL/kg). EDTA foi dissolvido em PBS na concentração de 0,5 M pH 8,0. O azul de Tripán foi dissolvido em PBS na concentração de 0,4%. A dose de pregabalina (30 mg/kg, v.o.) foi escolhida baseada em estudos prévios do laboratório (NONES *et al.*, 2013; HUMMIG *et al.*, 2014) e outros grupos (NAGAKURA *et al.*, 2009; BAASTRUP *et al.*, 2011; BANNISTER *et al.*, 2011; NARITA *et al.*, 2012; MURAI *et al.*, 2016).

3.3 MANUTENÇÃO E INOCULAÇÕES DAS CÉLULAS TUMORAIS

O carcinoma facial foi induzido através da inoculação de células tumorais Walker-256B no lado direito da região de inserção das vibrissas (ONO *et al.*, 2009; GAMBETA *et al.*, 2016). Antes da inoculação facial, as células foram mantidas *in vivo* através de inoculação intraperitoneal na concentração de 1×10^7 céls/mL. Após 5-7 dias da primeira inoculação intraperitoneal, os animais foram eutanasiados e submetidos à laparotomia para a coleta do líquido ascítico, o qual foi acrescentado EDTA (1:1; pH 8,0). Em câmara de Neubauer foi avaliado a viabilidade celular pelo teste de exclusão com Azul de Tripán 0,4% (BRIGATTE *et al.*, 2007) e contabilizada apenas as células viáveis. Foi repetida então a inoculação intraperitoneal na mesma concentração (repique).

Após o terceiro repique as células tumorais já apresentavam viabilidade de produzir tumor sólido. Para a indução do carcinoma facial, os animais foram anestesiados com uma solução de xilazina (7,5 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg) por via intraperitoneal, e uma suspensão contendo 2×10^6 céls em 100 μ L foi injetada via subcutânea na região de inserção das vibrissas do lado direito da face. Animais do grupo controle (Sham) receberam o mesmo volume de veículo (tampão salina-fosfato).

3.4 TESTES COMPORTAMENTAIS

No presente estudo foram utilizados os seguintes testes comportamentais para avaliar a nocicepção evocada e espontânea, e o comportamento do tipo ansioso:

3.4.1 Hiperalgesia mecânica facial

Para avaliar a hiperalgesia mecânica facial, os animais foram alocados individualmente em caixas de observação, para um tempo de ambientação de no mínimo 2 horas. Em seguida o limiar mecânico foi avaliado utilizando uma série de filamentos de Von Frey (Semmes-Weinstein monofilaments, Stoelting, USA: 0,04 g; 0,07 g; 0,16 g; 0,4 g; 1,0 g; 2,0 g; 4,0 g, e 8,0 g) como descrito previamente (CHICHORRO *et al.*, 2006). Cada filamento foi aplicado no lado direito da face, na região central da área de inserção das vibrissas, 3 vezes consecutivas, com um intervalo de ~3 s entre cada aplicação. O limiar mecânico foi considerado o filamento que evocou duas vezes respostas nociceptivas (retirada rápida da cabeça, reações de ataque/escape ao filamento ou rápido *grooming* facial). Apenas os animais que não apresentaram estes comportamentos na fase de seleção, após a aplicação de todos os filamentos, foram incluídos nos experimentos subsequentes, isto é, aqueles que possuíram um limiar basal de resposta à estimulação mecânica igual ou superior a 8 g. Para discriminar os grupos de animais hiperalgésicos de não hiperalgésicos, após a inoculação das células tumorais, foi considerada hiperalgesia mecânica facial quando os animais apresentavam limiar mecânico inferior ou igual a 4 g.

3.4.2 Labirinto em cruz elevado

Para avaliar o comportamento relacionado à ansiedade os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado conforme descrito por PELLOW *et al.* (1985). Foi utilizado um aparato de madeira, elevado a 50 cm do chão, o qual apresenta 4 braços, sendo 2 abertos e 2 fechados, que apresenta no cruzamento entre os braços uma área central de 10 cm². Para a realização desse teste, os animais foram colocados individualmente no centro do aparato e foi gravado o

comportamento do animal durante 5 minutos. Foi avaliado o tempo que o animal permaneceu nos braços abertos e o número de entrada nos braços abertos como parâmetro de comportamento do tipo ansioso, onde o aumento no tempo de permanência e número de entrada nos braços abertos é um indicativo de efeito do tipo ansiolítico. O número de entradas nos braços fechados foi avaliado como parâmetro de atividade locomotora espontânea, sendo considerada uma entrada quando o animal ultrapassou com as 4 patas as delimitações de cada braço. Foram excluídos os animais que caíram do aparato durante o teste.

3.4.3 Transição claro-escuro

O teste de transição claro-escuro desenvolvido por CRAWLEY e GOODWIN (1980) permite também avaliar o comportamento de ansiedade. O aparato consiste em uma caixa de madeira (altura = 30 cm, comprimento = 48 cm, largura = 24 cm), dividida igualmente em dois compartimentos, sendo um compartimento escuro, pintado de preto, não iluminado, e outro compartimento claro, pintado de branco e iluminado com uma fonte luminosa de 100 lux. Ainda, esse aparato possuiu uma abertura no centro com dimensão de 10×10 cm, local onde os animais são posicionados no início do teste, com livre acesso aos dois compartimentos. O teste é baseado na aversão inata dos animais por lugares com alta claridade, existindo um conflito do animal na exploração dos compartimentos ou esquiva do compartimento claro, sendo que o aumento no tempo de permanência no compartimento claro é um indicativo de efeito do tipo ansiolítico. Os animais foram colocados individualmente no aparato com livre acesso aos dois compartimentos e foi gravado o comportamento do animal durante 5 minutos. Foi contabilizado o tempo em que cada animal permaneceu no compartimento claro como parâmetro de ansiedade, e o número de transições entre os compartimentos como parâmetro de atividade locomotora espontânea.

3.4.4 Campo aberto

O teste do campo aberto foi utilizado para avaliar a atividade locomotora dos animais, bem como avaliar comportamentos relacionados à ansiedade (WALSH e CUMMINS, 1976). Os animais foram colocados no centro de uma arena quadrada

feita de madeira (50 cm de comprimento, 50 cm de largura e 40 cm de altura), dividida em 9 quadrantes. Foi gravado o movimento do animal durante 5 minutos. O número de cruzamentos entre os quadrantes foi avaliado como parâmetro de atividade locomotora. Comportamentos como o tempo na área central, entrada na área central, e o tempo de *grooming* facial foram avaliados como parâmetros de ansiedade.

3.4.5 *Grooming* espontâneo

Seis dias após a inoculação das células tumorais, os animais foram ambientados individualmente em caixas de acrílico por aproximadamente 15 minutos, seguido pela contabilização do *grooming* facial espontâneo durante 10 minutos subsequentes, sendo considerado apenas o movimento de limpeza facial com ambas as patas dianteiras. O aumento no tempo dispendido realizando o *grooming* facial foi considerado como parâmetro de nocicepção facial espontânea (HIDAKA *et al.*, 2011).

3.4.6 Preferência condicionada ao lugar

Para avaliar a dor tônica no modelo de carcinoma facial, foi realizado o teste de preferência condicionada ao lugar (*conditioned place preference* – CPP), metodologia proposta por KING *et al.* (2009) para avaliar o aspecto emocional da dor. Foi utilizado um aparato de madeira, o qual é dividido em três compartimentos: um compartimento central denominado de câmara neutra (altura = 36 cm, largura = 25 cm, comprimento = 10 cm), a qual possui uma luz de LED (~100 lux) aversiva para os animais; dois compartimentos adjacentes denominados de câmara teste (altura = 36 cm, largura = 25 cm, comprimento = 40 cm) possuindo pistas visuais e táteis distintas, possuindo uma câmara para registro acima do aparato. O teste foi realizado utilizando um protocolo com dois dias de condicionamento, sendo realizado do terceiro ao sexto dia após a inoculação das células tumorais. No primeiro dia do teste, dia do pré-condicionamento, os animais foram alocados na câmara neutra com livre acesso aos outros compartimentos do aparato por 15 minutos e foi contabilizado o tempo de permanência nas câmaras testes. Ratos que despenderam tempo <20% ou >80% em uma das câmaras testes foram excluídos

do experimento. Com o intuito de evitar um viés experimental, foi realizado um balanceamento para o condicionamento, a fim de que o tempo de pré-condicionamento entre os grupos não apresentasse diferença estatística. No segundo e terceiro dias do teste, i.e., nos dias de condicionamento, os animais foram tratados com veículo pela manhã e duas horas após foram confinados durante uma hora na câmara teste designada através do balanceamento. Após o condicionamento pela manhã, os animais retornaram às caixas. No período da tarde, i.e., quatro horas após o condicionamento com o veículo, os animais foram tratados com a droga teste e duas horas após foram confinados durante uma hora na câmara oposta ao condicionamento do período da manhã. No último dia, i.e., dia teste, os animais foram alocados na câmara neutra com livre acesso aos outros compartimentos por 15 minutos, e foi contabilizado o tempo de permanência na câmara pareada com a droga teste, com a finalidade de avaliar a preferência condicionada ao lugar pelo alívio da dor.

3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

A linha temporal dos protocolos experimentais desse estudo pode ser observada na Figura 2. Para as mediadas evocadas, foi avaliada a medida basal do limiar mecânico facial antes da inoculação das células tumorais. No terceiro dia após a inoculação das células tumorais, a hiperalgesia mecânica foi avaliada, e subsequente os animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e transição claro/escuro (TCE). Seis dias após a indução do tumor, em um grupo independente de animais, o mesmo protocolo foi realizado. No sexto dia após a inoculação das células tumorais a hiperalgesia mecânica facial foi avaliada seguida pelo tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (2 mL/kg, v.o.) e avaliação de hora em hora até 6 horas após o tratamento. Em um grupo independente, para avaliar o efeito do tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) no comportamento do tipo ansioso, seis dias após a inoculação das células tumorais, pela manhã foi avaliada a hiperalgesia mecânica facial seguida pelo tratamento com pregabalina ou veículo, e duas horas após o tratamento, os animais foram submetidos ao teste do LCE e TCE, ou teste do campo aberto.

Para as medidas de dor não evocada, seis dias após a inoculação, os

animais foram tratados com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (2 mL/kg, v.o.) e duas horas após o *grooming* facial espontâneo foi avaliado durante 10 minutos. Em um grupo independente de animais o teste do CPP foi avaliado. A sessão de pré-condicionamento foi realizada 3 dias após a inoculação das células tumorais, enquanto que as sessões de condicionamento foram realizadas 4 e 5 dias após a inoculação das células tumorais e a sessão teste foi realizada 6 dias após a inoculação das células tumorais.

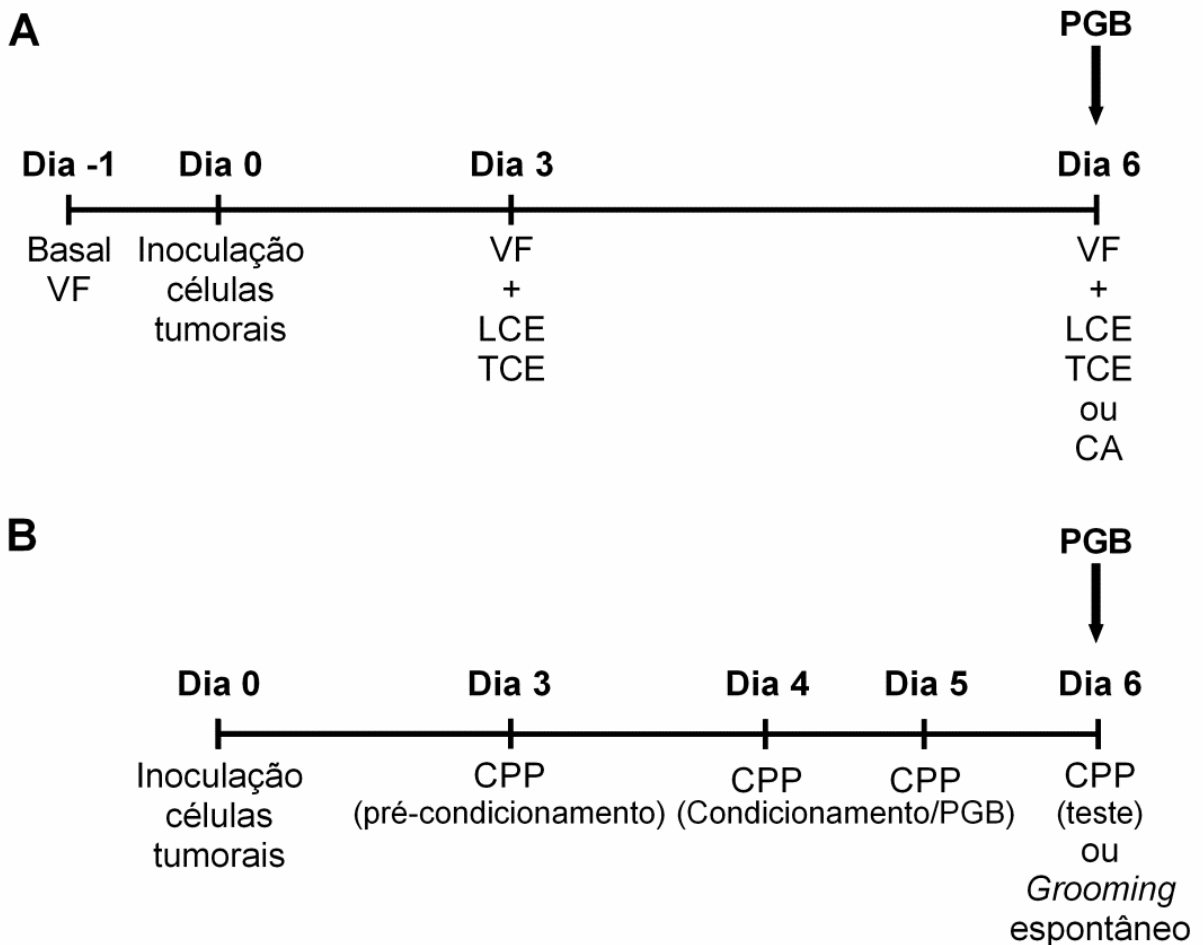


Figura 2 Linha temporal dos protocolos experimentais.

No Painel A está representado a linha temporal para as medidas evocadas. Foi realizada a medida basal do VF (dia -1) seguido pela inoculação das células tumorais Walker-256 (dia 0). A hiperalgesia mecânica facial e comportamento do tipo ansioso foram avaliados em grupos independentes nos dias 3 e 6 após a inoculação. No sexto dia após a inoculação foi avaliado o efeito da pregabalina (30 mg/kg, v.o.) ou veículo (2 mL/kg, v.o.) na hiperalgesia mecânica facial, comportamento do tipo ansioso e atividade locomotora. No Painel B está representada a linha temporal para as medidas não evocadas. No dia 0 foi realizada a inoculação das células tumorais, e seis dias após foi avaliado o *grooming* facial espontâneo. A sessão de pré-condicionamento do CPP foi realizada no dia 3, as sessões de condicionamento nos dias 4 e 5, e a sessão teste foi realizada no dia 6 após a inoculação das células tumorais. CA – campo aberto; CPP – preferencia condicionada ao lugar; LCE – labirinto em cruz elevado. PGB – pregabalina; TCE – transição claro/escuro; VF – Von Frey.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Análise de variância (ANOVA) de duas vias com ou sem medidas repetidas foi utilizada para analisar os dados, sendo a condição (tumor ou controle) e/ou tratamento e/ou tempo como fatores independentes. ANOVA de uma via foi utilizada quando apenas a condição foi utilizada como fator independente. Quando apropriado, teste de *post-hoc* de Bonferroni para comparações múltiplas foi realizado. Resultados foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. Todos os dados foram representados como a média \pm erro padrão da média (EPM). Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 6 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação temporal do comportamento do tipo ansioso em ratos com carcinoma facial

Previamente à inoculação das células tumorais na região das vibrissas, o limiar mecânico basal dos animais foi avaliado. No terceiro dia após a inoculação foi observado uma redução no limiar mecânico dos animais com tumor, ($*p < 0,05$ vs Sham) indicando o desenvolvimento de hiperalgesia mecânica facial (Figura 3A). Posteriormente os mesmos animais foram submetidos ao teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e transição claro/escuro (TCE). Quando avaliado o tempo de permanência no compartimento claro da TCE não foi observada diferença entre os grupos sham e tumor hiperalgésico e não hiperalgésico ($p > 0,05$; Figura 3B). Quando avaliado o tempo de permanência nos braços abertos do LCE também não foi observada diferença entre os grupos ($p > 0,05$; Figura 3C), entretanto foi detectada uma redução no número de entradas nos braços abertos ($*p < 0,05$ vs Sham; Figura 3D).

Seis dias após a inoculação das células tumorais também foi observada hiperalgesia mecânica facial nos animais com tumor ($*p < 0,05$ vs Sham; Figura 4A). Animais com tumor facial que desenvolveram hiperalgesia mecânica permaneceram menos tempo no compartimento claro no teste TCE ($*p < 0,05$ vs Sham; Figura 4B), indicativo de comportamento do tipo ansioso. É interessante notar que apenas os animais com tumor que desenvolveram hiperalgesia mecânica apresentaram comportamento do tipo ansioso quando avaliado o tempo de permanência nos braços abertos ($*p < 0,05$ vs Sham, $\#p < 0,05$ vs hiperalgésicos; Figura 4C). Em adição, foi observada uma redução no número de entradas nos braços abertos no grupo tumor hiperalgésico ($*p < 0,05$ vs Sham, $\#p < 0,05$ vs hiperalgésicos), indicando comportamento do tipo ansioso (Figura 4D).

A tabela 1 mostra a avaliação da atividade locomotora espontânea no teste do labirinto em cruz elevado e transição claro-escuro. No terceiro dia após a inoculação das células tumorais não foi observada diferença no número de entradas nos braços fechados no LCE e no número de transições na TCE entre os grupos ($p > 0,05$). Seis dias após a inoculação não foi detectado comprometimento na

atividade locomotora espontânea entre os grupos, pois não houve diferença significativa tanto no número de entrada nos braços fechados ($p>0,05$) quanto no número de transições ($p>0,05$).

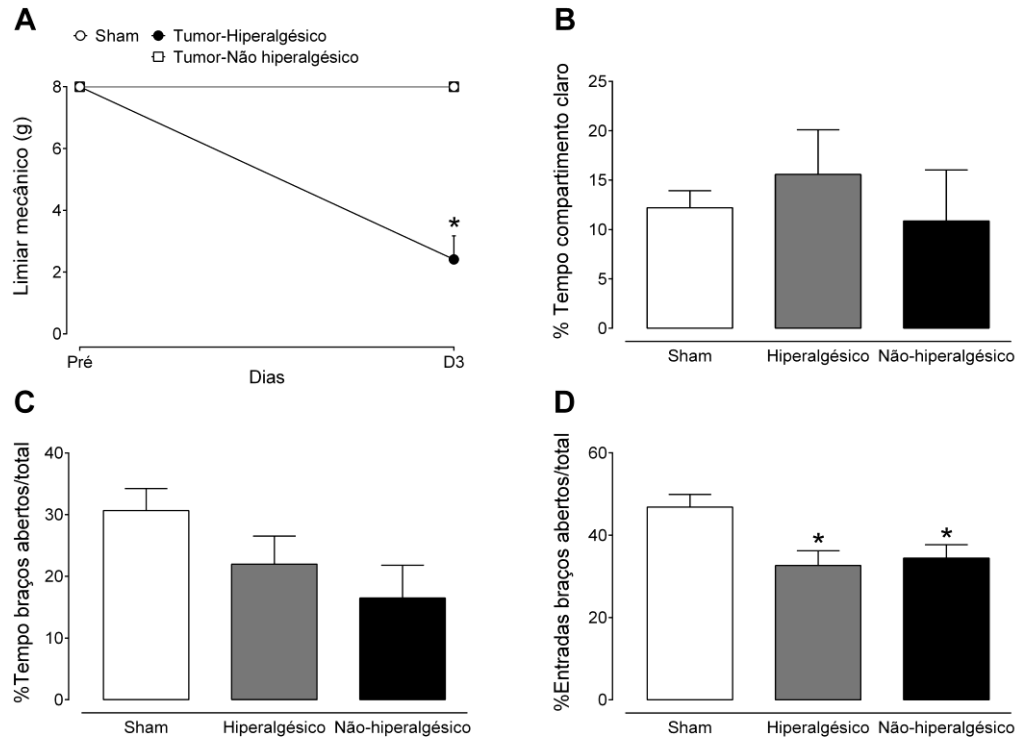


Figura 3 Avaliação comportamental no terceiro dia após a inoculação facial das células tumorais.

A hiperalgesia mecânica facial foi avaliada antes (pré) e no terceiro dia (D3) após a inoculação das células tumorais (Painel A, $*p<0,05$ vs Sham; $n=8-12$). No D3 foi avaliada nos mesmos animais a porcentagem de tempo no compartimento claro na TCE (Painel B, $n=6-8$), a porcentagem de tempo nos braços abertos no LCE (Painel C, $n=6-8$) e a porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE (Painel D, $*p<0,05$ vs Sham; $n=6-8$). LCE: labirinto em cruz elevado; TCE: transição claro/escuro; VF – Von Frey. ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. Todos os gráficos apresentam a média \pm EPM.

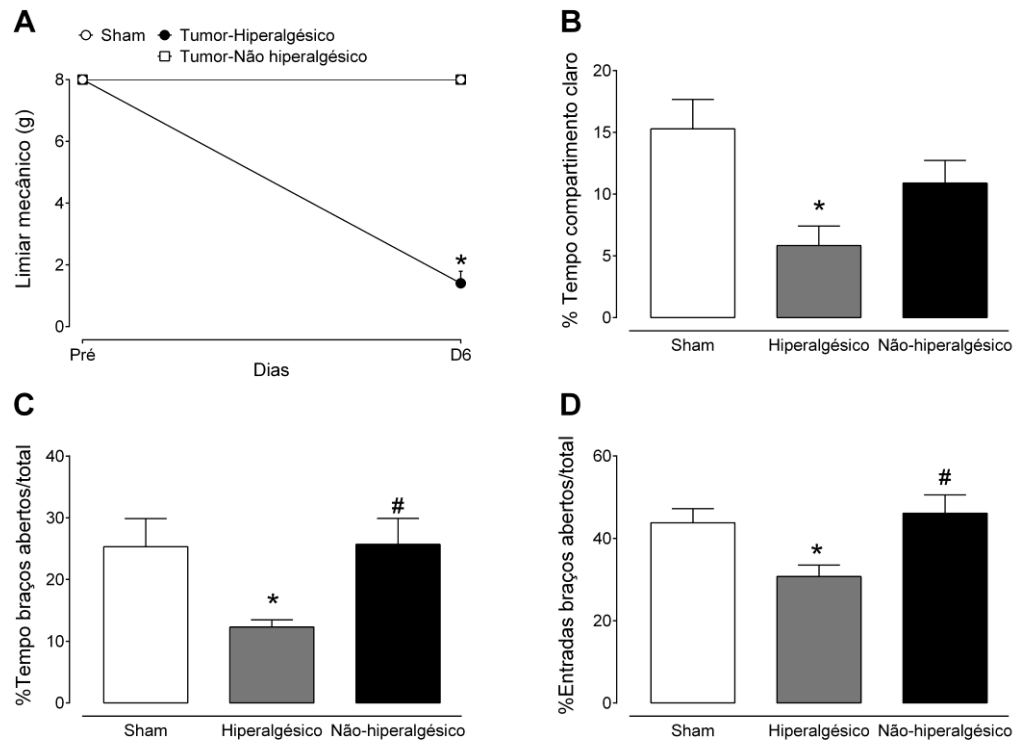


Figura 4 Avaliação comportamental no sexto dia após a inoculação facial das células tumorais.

A hiperalgesia mecânica facial foi avaliada antes (pré) e no sexto dia (D6) após a inoculação das células tumorais (Painel A, * $p < 0,0001$ vs Sham; $n = 8-10$). No D6 foi avaliada nos mesmos animais a porcentagem de tempo no compartimento claro na TCE (Painel B, * $p < 0,05$ vs Sham; $n = 8-10$), a porcentagem de tempo nos braços abertos no LCE (Painel C, * $p < 0,05$ vs Sham, # $p < 0,05$ vs hiperalgésicos; $n = 8-10$) e a porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE (Painel D, * $p < 0,05$ vs Sham, # $p < 0,05$ vs hiperalgésicos; $n = 8-10$). LCE: labirinto em cruz elevado; TCE: transição claro/escuro; VF – Von Frey. ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post-hoc* de *Bonferroni*. Todos os gráficos apresentam a média \pm EPM.

Tabela 1 Avaliação da atividade locomotora espontânea.

D3	Sham	Hiperalgésico	Não-hiperalgésico
Número de entradas braços fechados	10,0 \pm 0,5	9,8 \pm 0,7	6,8 \pm 1,3
Número de transições	7,6 \pm 0,6	7,8 \pm 1,6	5,0 \pm 2,2
D6			
Número de entradas braços fechados	8,2 \pm 0,6	6,8 \pm 0,4	6,1 \pm 0,8
Número de transições	6,3 \pm 1,1	3,5 \pm 0,8	4,3 \pm 0,7

O número de entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado e o número de transições na transição claro/escuro foram usados como parâmetro de atividade locomotora espontânea. Não foi observado comprometimento locomotor entre os grupos no D3 ($n = 6-8$) e no D6 ($n = 8-10$). ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post-hoc* de *Bonferroni*. Os valores representam a média \pm EPM.

4.2 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na hiperalgesia mecânica associada ao carcinoma facial

Previamente à inoculação das células tumorais foi avaliado o limiar basal dos animais à estimulação mecânica da face com filamentos de Von Frey. No sexto dia pós-inoculação (D6) essa avaliação foi repetida e observou-se que o grupo com tumor apresentou uma redução no limiar mecânico ($*p<0,05$ vs Sham-Vei). Após o tratamento com pregabalina foi observado um aumento no limiar mecânico no grupo com tumor da 2ª até a 4ª hora ($\#p<0,05$ vs Tumor-Vei; Figura 5). Não foi observada diferença no grupo Sham após o tratamento com pregabalina ou veículo ($p>0,05$).

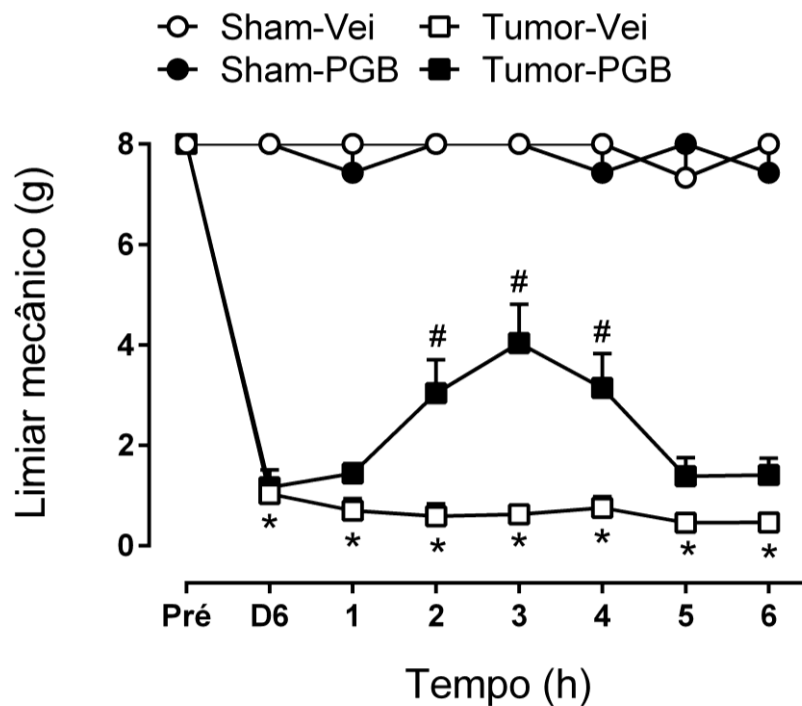


Figura 5 Tratamento sistêmico agudo com pregabalina atenuou a hiperalgesia mecânica facial induzida pelo tumor.

Previamente a inoculação das células tumorais o limiar mecânico facial foi avaliado (Pré) e foi observada uma redução no limiar de força (g) no sexto dia após a inoculação (D6) no grupo tumor ($*p<0,0001$ vs Sham-Vei; $n=6-10$). O tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) aumentou o limiar no grupo tumor da 2ª até a 4ª hora após o tratamento ($\#p<0,01$ vs Tumor-Vei; $n=6-10$). PGB: pregabalina; Vei: veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. Todos os gráficos apresentam a média \pm EPM.

4.3 Tratamento com pregabalina apresentou efeito do tipo ansiolítico nos animais com carcinoma facial

Seis dias após a inoculação das células tumorais foi observado uma redução no limiar mecânico facial no grupo tumor (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei; Figura 6A). Apenas os animais com tumor que desenvolveram hiperalgesia mecânica foram tratados com pregabalina. Duas horas após o tratamento foi observado o comportamento do tipo ansioso no grupo tumor tratado com veículo quando avaliado o tempo de permanência no compartimento claro na TCE (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei; Figura 6B), no tempo despendido nos braços abertos e no número de entradas nos braços abertos no LCE (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei; Figuras 6C e 6D, respectivamente). O tratamento sistêmico com pregabalina foi capaz de aumentar o tempo nos braços abertos (# $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; Figura 6C) e o número de entradas nos braços abertos (# $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; Figura 6D) no LCE apenas no grupo com tumor. Por outro lado, não foi observado o mesmo efeito quando avaliado o tempo de permanência no compartimento claro da TCE ($p > 0,05$; Figura 6B).

Na tabela 2 está representado o efeito do tratamento com pregabalina na atividade locomotora espontânea. Não foi observado comprometimento locomotor quando avaliado o número de entradas nos braços fechado no LCE e no número de transições na TCE ($p > 0,05$). Para assegurar do efeito do tratamento com pregabalina na atividade locomotora, o teste do campo aberto foi realizado em um grupo independente de animais. Animais com tumor tratados com veículo cruzaram menos em relação ao grupo Sham (* $p < 0,05$), entretanto o tratamento com pregabalina foi capaz de aumentar o número de cruzamento nesses animais (# $p < 0,05$ vs Tumor-Vei). Interessante que os animais com tumor tratados com veículo passaram mais tempo realizando *grooming* facial (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei) o qual foi reduzido com o tratamento com pregabalina (# $p < 0,05$ vs Tumor-Vei), o que poderia explicar o número de cruzamentos nesse grupo. Além disso, foi observado que os animais com tumor entraram menos na área central e passaram menos tempo nessa área (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei), indicando novamente um comportamento do tipo ansioso, entretanto, o tratamento com a pregabalina diminuiu esses parâmetros no grupo Sham (* $p < 0,05$), sem apresentar efeito no grupo tumor.

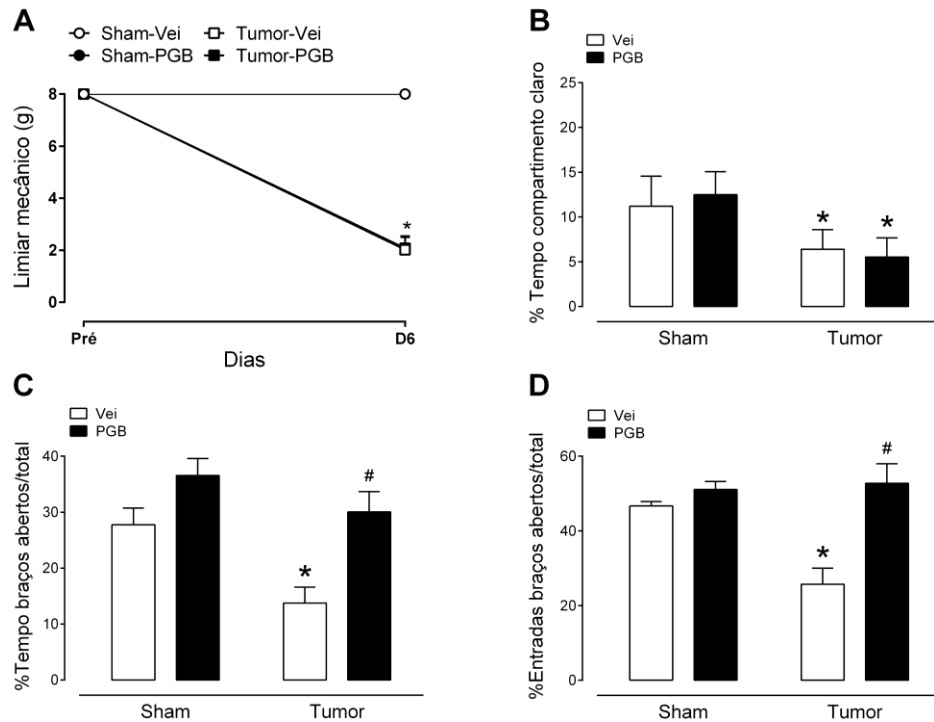


Figura 6 Tratamento sistêmico agudo com pregabalina reduziu o comportamento do tipo ansioso nos animais tumor que desenvolveram hiperalgesia mecânica facial.

Hiperalgesia mecânica facial foi observada no sexto dia (D6) após a inoculação das células tumorais (Painel A, * $p < 0,0001$ vs Sham; $n = 8-10$). Duas horas após o tratamento, foi avaliado nos mesmos animais a porcentagem de tempo no compartimento claro na TCE (Painel B, * $p < 0,05$ vs Sham; $n = 8-10$), a porcentagem de tempo nos braços abertos no LCE (Painel C, * $p < 0,001$ vs Sham-Vei, # $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; $n = 8-10$) e a porcentagem de entradas nos braços abertos no LCE (Painel D, * $p < 0,001$ vs Sham-Vei, # $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; $n = 8-10$). LCE: labirinto em cruz elevado; PGB: pregabalina; TCE: transição claro/escuro; Vei: veículo; VF – Von Frey. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. Todos os gráficos apresentam a média \pm EPM.

Tabela 2 Efeito do tratamento sistêmico agudo com pregabalina na atividade locomotora espontânea.

	Sham-Vei	Sham-PGB	Tumor-Vei	Tumor-PGB
Número de entradas braços fechados	7,2 \pm 0,5	9,3 \pm 0,9	6,1 \pm 0,6	4,8 \pm 0,7
Número de transições	5,4 \pm 1,1	7,0 \pm 1,3	3,7 \pm 0,9	2,7 \pm 0,9
Número de cruzamentos	88,0 \pm 6,8	83,2 \pm 5,9	27,1 \pm 3,4*	51,0 \pm 5,0*#
Grooming espontâneo (s)	8,2 \pm 2,0	10,1 \pm 2,3	55,1 \pm 8,9*	27,0 \pm 1,9#
Tempo na área central	24,3 \pm 3,6	10,8 \pm 2,1*	9,5 \pm 2,6*	12,36 \pm 3,3*
Número de entradas na área central	9,4 \pm 1,2	5,1 \pm 0,7*	2,5 \pm 0,5*	4,6 \pm 0,8*

Duas horas após o tratamento com pregabalina (30 mg/kg, v.o.) não foi observado comprometimento locomotor quando avaliado o número de entradas nos braços fechados no labirinto em cruz elevado e o número de transições na transição claro/escuro ($n = 8-10$). No teste do campo aberto foi avaliado o número de cruzamentos entre os quadrantes, o tempo de grooming facial espontâneo, o tempo e o número de entradas na região central (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei, # $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; $n = 8-12$). PGB: pregabalina; Vei: veículo. ANOVA de duas vias seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni. Os valores representam a média \pm EPM.

4.4 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na dor não evocada associada ao carcinoma facial

No sexto dia após a inoculação das células tumorais foi observado um aumento no tempo de *grooming* facial espontâneo no grupo tumor tratado com veículo, o qual foi reduzido após o tratamento com pregabalina, sugerindo efeito antinociceptivo na dor espontânea (* $p < 0,05$ vs Sham-Vei, # $p < 0,05$ vs Tumor-Vei; Figura 7A). No grupo Sham o tratamento com pregabalina não alterou o tempo de *grooming* facial espontâneo ($p > 0,05$).

No teste do CPP, dois dias de pareamento com pregabalina foi capaz de induzir preferencia condicionada ao lugar (CPP) no grupo com tumor, observado pelo aumento no tempo despendido na câmara pareada com pregabalina no pós-condicionamento (* $p < 0,05$ vs Tumor-Pré-condicionamento; Figura 7B). Não foi observada diferença estatística no tempo de permanência na câmara pareada com pregabalina no grupo Sham após o condicionamento ($p > 0,05$).

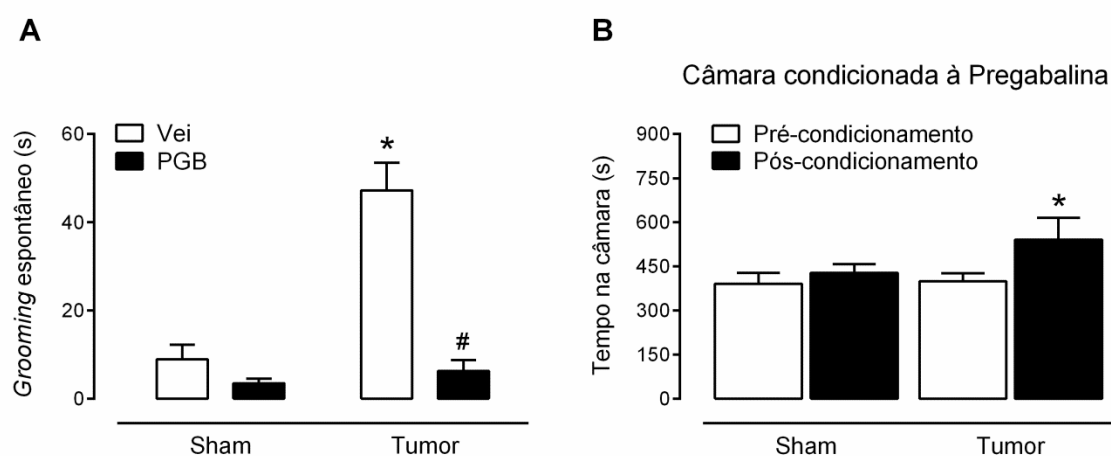


Figura 7 Efeito do tratamento sistêmico com pregabalina na dor não evocada associada ao câncer facial.

No sexto dia após a inoculação das células tumorais foi observada uma redução no grooming espontâneo no grupo tumor tratado com pregabalina (30 mg/kg, p.o.) (Painel A, * $p < 0,0001$ vs Sham-Vei, # $p < 0,0001$ vs Tumor-Vei; $n = 9-20$). Pareamento de dois dias com a pregabalina (30 mg/kg, p.o.) induziu preferência condicionada ao lugar no grupo tumor (Painel B, * $p < 0,05$ vs Tumor-Pré-condicionamento; $n = 11-12$), mas não no grupo sham. PGB: pregabalina; Vei: veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas, seguido pelo teste de *post-hoc* de *Bonferroni*. Todos os gráficos apresentam a média \pm EPM.

5 DISCUSSÃO

Nossos dados sugerem uma relação causal entre a hiperalgesia mecânica facial e o comportamento do tipo ansioso, visto que apenas os animais tumor-hiperalgésicos desenvolveram comportamento do tipo ansioso. Ademais, o tratamento com pregabalina foi eficaz em produzir efeito antinociceptivo e do tipo ansiolítico nos animais com tumor, sugerindo que a mesma pode representar uma opção terapêutica promissora no tratamento da dor e ansiedade associadas ao câncer na região orofacial.

O modelo de carcinoma facial em ratos permite a avaliação da nocicepção não evocada e evocada, bem como o comportamento do tipo ansioso. Nosso estudo demonstrou que o tratamento sistêmico agudo com a pregabalina foi capaz de reduzir tanto a nocicepção não evocada quanto a evocada e apresentou efeito do tipo ansiolítico nos animais com tumor, sem interferir na atividade locomotora. Mais ainda, foi demonstrado que o comportamento do tipo ansioso foi detectado após o estabelecimento das alterações sensoriais na face e apenas nos animais com tumor que desenvolveram a hiperalgesia mecânica facial, sugerindo que a ansiedade é posterior ao desenvolvimento da dor.

5.1 Relação entre a nocicepção e o comportamento do tipo ansioso

Nossos dados demonstraram que os animais começam a desenvolver hiperalgesia mecânica facial já no terceiro dia após a inoculação das células tumorais e o comportamento do tipo ansioso só foi observado no sexto dia, também demonstrando que a ansiedade é detectada após o estabelecimento da dor.

Vários estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que existe uma relação entre a dor crônica e a ansiedade. A incidência de ansiedade em pacientes com disfunções temporomandibulares crônica (dor muscular ou dor articular) chega a aproximadamente 30% dos pacientes (BERTOLI e DE LEEUW, 2016). Pacientes com neuralgia do trigêmeo apresentam maiores níveis de ansiedade e depressão em relação aos pacientes com dor facial atípica (MACIANSKYTE *et al.*, 2011). Recentemente, outro estudo que avaliou o impacto da neuralgia do trigêmeo na qualidade de vida dos pacientes relatou que mais de 50% dos pacientes eram

ansiosos (ZAKRZEWSKA *et al.*, 2017). Além disso, já foi observado que pacientes com migrânea também apresentam altos níveis de ansiedade (DINDO *et al.*, 2016; KUTAY *et al.*, 2017; PERES *et al.*, 2017).

Além dessas evidências clínicas, existem diversos estudos pré-clínicos que demonstraram a relação entre a nocicepção e a ansiedade. HASNIE *et al.* (2007) demonstrou em modelo de neuralgia pós-herpética que após inoculação de células infectadas com o vírus *Varicella zoster* na pata, os ratos desenvolveram hiperalgesia mecânica, a qual se iniciava após o 7º dia da infecção com o vírus, perdurando por aproximadamente 50 dias. Mais ainda, quando realizado o teste do campo aberto para avaliar o comportamento do tipo ansioso, foi observado que os animais infectados com o vírus apresentaram redução no número de entradas e no tempo de permanência no quadrante central do aparato, indicativo de comportamento do tipo ansioso. Além desse estudo, Rice e colaboradores demonstraram em modelo de polineuropatia simétrica distal associada à imunodeficiência humana (HIV) que os animais desenvolviam hiperalgesia mecânica e comportamento do tipo ansioso (WALLACE *et al.*, 2007). Interessantemente, em modelos de lesão de nervos espinais parecem existir diferenças com relação ao desenvolvimento de ansiedade dependendo do modelo utilizado. ROESKA *et al.* (2008) demonstrou que tanto em modelo de ligação parcial do nervo (PNL) ou constrição crônica do nervo ciático (CCI) os animais desenvolvem hiperalgesia mecânica. Entretanto, quando foi avaliado o tempo no braço aberto no labirinto em cruz elevado, foi observado comportamento do tipo ansioso apenas no grupo CCI. SEMINOWICZ *et al.* (2009) observou que em modelo de lesão parcial do nervo, os animais desenvolvem hiperalgesia mecânica e térmica dentro dos primeiros dias após a cirurgia, entretanto o comportamento do tipo ansioso só foi observado vinte semanas após o procedimento, sugerindo que o comportamento do tipo ansioso ocorre semanas após o início da dor.

Mais especificamente em relação à dor facial, cabe ressaltar que nossos resultados também corroboram algumas poucas evidências obtidas de estudos pré-clínicos utilizando diferentes modelos de dor facial. Em modelo de migrânea induzida por infusão de mediadores inflamatórios na dura-máter, os animais desenvolvem hiperalgesia mecânica periorbital, e 21 dias após a infusão foi observado que os animais apresentavam comportamento do tipo ansioso (ZHANG *et al.*, 2017). Em modelo de neuralgia do trigêmeo pela constrição do nervo infraorbital foi observado

redução no limiar mecânico e comportamento do tipo ansioso no grupo constricto (WANG *et al.*, 2015). Ademais, o comportamento do tipo ansioso foi detectado também em modelo de dor inflamatória aguda pela administração de capsaicina ou formalina na região orofacial (BAHAADDINI *et al.*, 2016; RAOOF *et al.*, 2016). Além desses estudos, dados prévios do nosso laboratório demonstraram que em modelo de carcinoma facial os animais desenvolvem hiperalgesia térmica ao calor e comportamento do tipo ansioso, sugerindo uma interação entre a dor de origem craniofacial e ansiedade (GAMBETA *et al.*, 2016).

Apesar das evidências expostas que tem demonstrado que há uma relação entre a nocicepção e o comportamento do tipo ansioso, nenhum estudo até o momento avaliou se a condição *per se* não alteraria o comportamento. O modelo utilizado nesse estudo permitiu separar os animais com tumor que desenvolveram ou não a hiperalgesia mecânica facial, permitindo então avaliar se a condição tumor não induziria o comportamento do tipo ansioso. Foi observado que os animais com tumor que desenvolveram hiperalgesia mecânica facial permaneceram menos tempo nos braços abertos e no compartimento claro, indicativo do comportamento do tipo ansioso. Entretanto, os animais com tumor que não desenvolveram hiperalgesia mecânica facial não apresentaram o comportamento do tipo ansioso. Com esses resultados podemos sugerir que o desenvolvimento do comportamento do tipo ansioso ocorre apenas após o estabelecimento das alterações sensoriais na face.

5.2 Efeito da pregabalina na nocicepção evocada

No presente estudo, o tratamento sistêmico por via oral com pregabalina foi capaz de reduzir a hiperalgesia mecânica facial nos animais com tumor, corroborando estudos prévios que já demonstraram o efeito antinociceptivo da pregabalina, na mesma dose utilizada neste estudo, em diferentes modelos de dor crônica facial. CAO *et al.* (2013) demonstrou que o tratamento com pregabalina foi capaz de aumentar o limiar mecânico facial em modelo de transecção parcial do nervo infraorbital, enquanto que Hummig *et al.* (2014) demonstraram que a pregabalina foi capaz de reduzir a hiperalgesia térmica ao calor em modelo de constrição do nervo infraorbital e no modelo de carcinoma facial. Em modelo de diabetes induzido por estreptozotocina foi observado que os animais desenvolveram

hiperalgesia térmica ao calor e ao frio, a qual foi reduzida pelo tratamento sistêmico com a pregabalina (NONES *et al.*, 2013). Em modelos de dor inflamatória facial aguda, pela administração de formalina, carragenina ou ainda no teste de capsaicina orofacial, o tratamento com pregabalina na dose de 30 mg/kg foi eficaz em reduzir as respostas nociceptivas (HUMMIG *et al.*, 2014). Esses resultados fornecem evidências que o tratamento com a pregabalina pode ser útil no controle da dor facial evocada por estímulos de diferentes origens (i.e. térmica ou mecânica), além da capacidade de reduzir o componente da dor não evocada. Nossos dados fornecem evidências adicionais para a utilidade da pregabalina como uma importante ferramenta no controle da dor de origem orofacial. Tendo isso em vista, na prática clínica, a pregabalina tem sido utilizada para o controle da dor neuropática (FINNERUP *et al.*, 2010; FINNERUP *et al.*, 2015), bem como tem sido avaliada para o controle da dor associada ao câncer (FALLON, 2013; ESIN e YALCIN, 2014; RAMAN *et al.*, 2016).

Evidências clínicas já demonstraram a eficácia da pregabalina no controle de dores de origem craniofacial. Foi reportado que o tratamento com pregabalina por 4 semanas foi capaz de reduzir a dor e a frequência dos ataques de dor em pacientes com neuralgia do trigêmeo (OBERMANN *et al.*, 2008). Mais ainda, foi observado que o tratamento com pregabalina reduz a dor e sintomas comórbidos relacionados à neuralgia do trigêmeo, melhorando a qualidade de vida do paciente (PEREZ *et al.*, 2009). Pacientes com migrânea crônica apresentaram uma melhora clinicamente relevante em relação à frequência de ataques e intensidade da dor após tratamento crônico com pregabalina (CALANDRE *et al.*, 2010). Ademais, foi reportado que o tratamento com pregabalina durante 12 semanas foi capaz de aliviar a alodinia em pacientes com migrânea (ZHANG *et al.*, 2015). Em um relato de caso de uma paciente com neuralgia do glossofaríngeo foi relatado o alívio completo da dor após o tratamento com pregabalina (KITCHENER, 2006).

5.3 Efeito do tipo ansiolítico da pregabalina

Existem evidências crescentes clínicas e pré-clínicas de que o tratamento com a pregabalina apresenta efeito ansiolítico em diversas condições (FIELD *et al.*, 2001; MONTGOMERY *et al.*, 2013), incluindo na ansiedade associada à dor

(BAASTRUP e FINNERUP, 2008; PEREZ *et al.*, 2009). Nesse sentido, nossos dados demonstraram que o tratamento com pregabalina foi capaz de apresentar efeito do tipo ansiolítico nos animais com tumor quando avaliado o comportamento no labirinto em cruz elevado. Foi reportado que o tratamento crônico com pregabalina apresentou efeito do tipo ansiolítico em modelo de ligação parcial do nervo ciático em camundongos, entretanto não foi observado o mesmo efeito nos animais do grupo sham (LA PORTA *et al.*, 2016), corroborando nossos resultados. Em modelo de constrição do nervo ciático em ratos foi observado que os animais desenvolveram comportamento do tipo ansioso, o qual foi reduzido pelo tratamento agudo com gabapentina, uma droga com mecanismo de ação similar ao da pregabalina (ROESKA *et al.*, 2008). Esses estudos indicam que os gabapentinóides podem ser utilizados como uma ferramenta farmacológica para o controle da ansiedade associada à dor. Apesar do tratamento com pregabalina ter apresentado um efeito do tipo ansiolítico evidente no teste do labirinto em cruz elevado, cabe ressaltar que o mesmo não foi observado no teste da transição claro-escuro. A ausência no efeito do tipo ansiolítico da droga pode ser devido às premissas ou a sensibilidade do teste da transição claro-escuro, em que foi avaliada a aversão ao compartimento claro.

Em adição, tem sido demonstrado o efeito do tipo ansiolítico da pregabalina em modelos de estresse/ansiedade não relacionada à dor. Assim, em modelo animal de TEPT, após a exposição ao odor de um predador, foi observado que o tratamento com pregabalina foi capaz de atenuar o comportamento do tipo ansioso quando os animais foram avaliados no teste do labirinto em cruz elevado (ZOHAR *et al.*, 2008). FIELD *et al.* (2001) verificou o efeito da pregabalina em dois modelos distintos de ansiedade, o teste do labirinto em cruz elevado e o teste de conflito, e reportou que o tratamento com pregabalina induziu um efeito do tipo ansiolítico. Ademais, foi observado que animais que recebem choque nas patas apresentam um aumento de vocalizações ultrassônicas aversivas (22 kHz), as quais foram reduzidas após o tratamento com pregabalina (BARDIN *et al.*, 2010).

Abordagens neurofarmacológicas podem apresentar resultado falso positivo ou negativo devido a efeitos sedativos ou por estimulação a atividade locomotora e exploratória (O'NEIL e MOORE, 2003). Por essa razão parâmetros de atividade locomotora foram avaliados. O teste do labirinto em cruz elevado e o teste da transição claro-escuro permitem avaliar a atividade locomotora dos animais pelo número de entradas nos braços fechados e o número de transições entre os

compartimentos, respectivamente. Cabe ressaltar que no presente estudo o tratamento com pregabalina não resultou em comprometimento locomotor, corroborando estudos prévios que demonstraram que o tratamento com pregabalina não promove comprometimento locomotor, pelo menos na dose utilizada (LAU *et al.*, 2013; HARTE *et al.*, 2016; NONES *et al.*, 2013). Entretanto é importante mencionar que no presente estudo foi observada uma redução significativa no número de cruzamentos no grupo tumor quando os animais foram avaliados no campo aberto, a qual foi revertida após o tratamento com pregabalina. Entretanto, também foi observado que os animais com tumor passaram mais tempo realizando *grooming* facial durante o teste, e que esse comportamento também foi reduzido pelo tratamento com pregabalina. Portanto, podemos sugerir que a redução no número de cruzamentos pode ser devido ao aumento no tempo de *grooming* facial, sendo que esse comportamento pode estar relacionando a dor espontânea e a ansiedade (SACHS, 1988; VOS *et al.*, 1998; NIN *et al.*, 2012; DESEURE e HANS, 2017). Tendo em vista que o teste do campo aberto permite ainda avaliar comportamentos relacionados com a ansiedade através do número de entradas e tempo de permanência no quadrante central (WALSH e CUMMINS, 1976; RAMOS, 2008), no presente estudo, conforme o esperado foi observado o comportamento do tipo ansioso no grupo tumor. Todavia, não foi observado o efeito do tipo ansiolítico da pregabalina em nenhum dos grupos avaliados. Apesar do resultado contraditório, estudos já demonstraram que a pregabalina não altera esses comportamentos em animais com lesão de nervo (GALAN-ARRIERO *et al.*, 2014, 2015). Tendo isso em vista, nossos resultados indicam que o tratamento com pregabalina apresenta efeito do tipo ansiolítico apenas nos animais com alterações sensoriais faciais.

5.4 Efeito da pregabalina na dor não evocada

Estudos prévios já demonstraram que pacientes com câncer de cabeça e pescoço reportam dor espontânea como um dos sintomas mais comuns, sendo um sintoma que reduz significativamente a qualidade de vida do paciente (LAM e SCHMIDT, 2011). Nosso estudo demonstrou que seis dias após a inoculação das células tumorais os animais apresentaram um aumento no *grooming* facial espontâneo, sugestivo de um componente da dor espontânea, o que corrobora

estudos prévios (ONO *et al.*, 2009; HIKADA *et al.*, 2011; KOPRUSZINSKI, 2016). Nos estudos de HIKADA *et al.* (2011) e ONO *et al.* (2009) foi observado um aumento no tempo de *grooming* espontâneo facial no terceiro e quarto dia após a inoculação das células tumorais, respectivamente, enquanto que no nosso grupo (KOPRUSZINSKI, 2016) foi observado apenas no sexto dia após a inoculação das células tumorais, corroborando nossos resultados. O tratamento sistêmico com pregabalina foi capaz de reduzir significativamente o tempo de *grooming* espontâneo facial no grupo tumor, demonstrando um possível efeito na dor espontânea. Em consonância com esta observação, em modelo de dor neuropática pela constrição crônica do nervo ciático (CCI) foi observado que os animais CCI apresentavam um aumento na frequência de movimento da pata traseira, a qual foi associada como um componente de dor espontânea, e a mesma foi reduzida pelo tratamento sistêmico com pregabalina na dose 30 mg/kg (MURAI *et al.*, 2016).

Um aspecto da dor que tem sido difícil de mensurar em modelos animais é a dor tônica persistente, a qual é sentida mesmo na ausência de qualquer estímulo externo (KING *et al.*, 2009; NAVRATILOVA *et al.*, 2013). KING *et al.* (2009) desenvolveu uma metodologia capaz de avaliar o aspecto motivacional da dor tônica, e diversos estudos utilizaram esse paradigma para demonstrar que o alívio da dor produz preferência condicionada ao lugar (CPP) por um contexto distinto (REMENIUK *et al.*, 2015; QU *et al.*, 2011; OKUN *et al.*, 2011; DE FELICE *et al.*, 2013). Em modelo de axotomia de nervo, onde é difícil a avaliação de medidas evocadas, a administração intratecal de clonidina (agonista α_2 -adrenérgico) ou a administração intra-RVM de lidocaína foi capaz de induzir CPP, demonstrando a existência do componente espontâneo da dor nesse modelo (QU *et al.*, 2011). Em modelo de dor inflamatória crônica pela administração de adjuvante completo de Freund (CFA) na pata foi observado que o tratamento com clonidina espinhal ou lidocaína na fossa poplíteia foi eficaz em produzir CPP (OKUN *et al.*, 2011).

Recentemente estudos que envolvem o sistema trigeminal também evidenciaram o componente de dor espontânea em diferentes modelos. DE FELICE *et al.* (2013) demonstraram em modelo de dor cefálica pela administração de mediadores inflamatórios na dura-máter que os animais passavam mais tempo na câmara pareada com a lidocaína administrada intra-RVM. Em modelo de dor neuropática trigeminal através da constrição do nervo infraorbital (CION) foi demonstrado que induz dor tônica, a qual foi observada 15 dias após a cirurgia

através da administração de lidocaína intra-RVM (NONES *et al.*, 2017). Além desses modelos de dor craniofacial, foi observada em modelo de carcinoma facial a presença da dor tônica nos animais com tumor, nos quais o tratamento sistêmico tanto com o opióide morfina quanto com o antagonista endotelinérgico bosentana foi capaz de aumentar o tempo de permanência na câmara pareada com a droga (KOPRUSZINSKI, 2016), corroborando os dados do presente estudo, em que esse paradigma também foi utilizado para revelar a dor tônica nos animais no sexto dia após a inoculação das células tumorais.

Além disso, os nossos resultados demonstraram que o tratamento com pregabalina foi capaz de induzir CPP apenas no grupo tumor, sugerindo que a pregabalina é capaz de atenuar a dor tônica relacionada a essa condição. Corroborando essa evidência, outros estudos que utilizaram metodologias diferentes que permitem avaliar o estado afetivo-motivacional da dor demonstram que a pregabalina é capaz de reduzir esse aspecto em um paradigma aversivo. O paradigma de fuga/esquiva de lugar (PEAP) baseia-se no pressuposto de fuga ou esquiva de um estímulo nocivo, sendo este considerado aversivo, de tal modo permitindo avaliar o estado afetivo-motivacional da dor (FUCHS e MCNABB, 2012). Quando esse paradigma foi aplicado em animais com lesão no cordão espinal (SCI), o tratamento com pregabalina resultou em uma redução no tempo de permanência no compartimento aversivo (BAASTRUP *et al.*, 2011; GALAN-ARRIERO *et al.*, 2014). Além do PEAP, foi desenvolvido um sistema de conflito mecânico, um paradigma que utiliza o conflito da estimulação mecânica nociva e luz aversiva, onde o animal pode escapar de um ambiente aversivo e não nocivo, mas sujeito a passar por uma estimulação nociva, ou esquivar do compartimento nocivo permanecendo no ambiente aversivo, e foi observado que o tratamento com pregabalina foi capaz de reduzir a latência de escape do compartimento aversivo (HARTE *et al.*, 2016). Nossos dados corroboram essas evidências, e os resultados em conjunto indicam que o tratamento com a pregabalina é capaz de reduzir a dor tônica em diferentes modelos de dor crônica.

Um possível mecanismo para o efeito no componente emocional da dor é a capacidade da pregabalina reduzir a atividade neuronal espontânea no núcleo central da amígdala direita, uma região importante para as respostas emocionais relacionadas à dor (GONCALVES e DICKENSON, 2012; NEUGEBAUER, 2015). Outro possível mecanismo para o efeito antinociceptivo da pregabalina é através da

modulação do sistema inibitório descendente. Sabe-se que o sistema noradrenérgico possui um papel importante no controle inibitório descendente da dor, onde a ativação do receptor $\alpha 2$ -adrenérgico pode reduzir as respostas nociceptivas (KING *et al.*, 2009; NAVRATILOVA *et al.*, 2015). Tem sido sugerido que a ação dos gabapentinóides nas vias descendentes resulta na redução da atividade do GABA (ácido gama aminobutírico) e aumento dos níveis de glutamato no *locus coeruleus*. Essas ações resultariam no aumento da liberação de noradrenalina, levando a ativação do sistema descendente inibitório noradrenérgico promovendo então a liberação de noradrenalina no corno dorsal da medula com conseqüente ativação do receptor $\alpha 2$ -adrenérgico pré e pós-sináptico reduzindo a nocicepção (KREMER *et al.*, 2016).

Os VGCC também estão relacionados com a fisiopatologia da ansiedade, pois o aumento na liberação de neurotransmissores excitatórios como o glutamato na BLA, vHPC e BNST, pode mediar às respostas relacionadas à ansiedade (FELIX-ORTIZ *et al.*, 2013; MICO e PRIETO, 2012; TOVOTE *et al.*, 2015; ZAMPONI *et al.*, 2015; ZAMPONI, 2016). Estudos prévios demonstraram que o efeito do tipo ansiolítico do tratamento com a pregabalina é alcançado pela ligação com a subunidade $\alpha 2\delta$ e inibição da liberação de neurotransmissores (BELLIOTTI *et al.*, 2005; LOTARSKI *et al.*, 2011). Além disso, sabe-se que a subunidade $\alpha 2\delta$ é altamente expressa em diversas regiões encefálicas, tais como a amígdala, ACC, IC e PAG que apresentam papel importante não somente para a ansiedade, mas também para a dor (MICO e PRIETO, 2012; STAHL *et al.*, 2013; ZHUO, 2016). Portanto, é possível que o papel ansiolítico e analgésico da pregabalina seja devido à sua habilidade de modular a liberação de diferentes neurotransmissores em substratos neurais comuns para o processamento da dor e da ansiedade.

6 CONCLUSÃO

Nossos resultados demonstraram que o modelo de carcinoma facial por inoculação de células tumorais Walker-256 em ratos induz comportamento do tipo ansioso apenas nos animais hiperalgésicos e após o estabelecimento das respostas nociceptivas não evocadas e evocadas. O tratamento agudo com a pregabalina demonstrou um ótimo perfil analgésico, especialmente na avaliação da dor espontânea, e ansiolítico em animais com tumor facial. Portanto, nossos dados sugerem que o tratamento com a pregabalina pode representar uma droga útil para o tratamento da dor e ansiedade em pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

Os resultados desse estudo estão sumarizados na tabela 3

Tabela 3 Avaliação comportamental em ratos com tumor facial e influência do tratamento com pregabalina

Teste	D3	D6	Pregabalina 30 mg/kg
Comportamento tipo ansioso	↔	↑	↓
Nocicepção evocada	↑	↑	↓
Nocicepção não evocada	-	↑	↓

Os símbolos ↑, ↓, ↔ e – indicam aumento, redução, sem alteração e não avaliado, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ACCO, A.; BASTOS-PEREIRA, A. L.; DREIFUSS, A. A. Characteristics and Applications of the Walker-256 Rat Tumour. In: S.G. Pandalai; Daniel Pouliquen (Org.). **The rat in cancer research: a crucial tool for all aspects of translational studies**. 1 ed. Trivandrum: Research Signpost/Transworld Research Network, 2012.

ANDREATINI, R.; BOERNGEN-LACERDA, R.; Z., F. D. Tratamento farmacológico do transtorno de ansiedade generalizada: perspectivas futuras. **Rev Bras Psiquiatr**, v. 23, n. 4, p. 233-242. 2001.

APA. **Diagnostical and Statistical Manual of Mental Disorders**. 5th edition. American Psychiatric Association, 2013.

BAASTRUP, C.; FINNERUP, N. B. Pharmacological management of neuropathic pain following spinal cord injury. **CNS Drugs**, v. 22, n. 6, p. 455-75. 2008.

BAASTRUP, C.; JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Pregabalin attenuates place escape/avoidance behavior in a rat model of spinal cord injury. **Brain Res**, v. 1370, p. 129-35. 2011.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p. 414-7. 2010.

BAHAADDINI, M.; KHATAMSAZ, S.; ESMAEILI-MAHANI, S.; ABBASNEJAD, M.; RAOOF, M. The role of trigeminal nucleus caudalis orexin 1 receptor in orofacial pain-induced anxiety in rat. **Neuroreport**, v. 27, n. 15, p. 1107-13. 2016.

BANNISTER, K.; SIKANDAR, S.; BAUER, C. S.; DOLPHIN, A. C.; PORRECA, F.; DICKENSON, A. H. Pregabalin suppresses spinal neuronal hyperexcitability and visceral hypersensitivity in the absence of peripheral pathophysiology. **Anesthesiology**, v. 115, n. 1, p. 144-52. 2011.

BARDIN, L.; GREGOIRE, S.; ALIAGA, M.; Malfetes, N.; VITTON, O.; LADURE, P.; NEWMAN-TANCREDI, A.; DEPOORTERE, R. Comparison of milnacipran, duloxetine and pregabalin in the formalin pain test and in a model of stress-induced ultrasonic vocalizations in rats. **Neurosci Res**, v. 66, n. 2, p. 135-40. 2010.

BELLIOTTI, T. R.; CAPIRIS, T.; EKHATO, I. V.; KINSORA, J. J.; FIELD, M. J.; HEFFNER, T. G.; MELTZER, L. T.; SCHWARZ, J. B.; TAYLOR, C. P.; THORPE, A. J.; VARTANIAN, M. G.; WISE, L. D.; ZHI-SU, T.; WEBER, M. L.; WUSTROW, D. J. Structure-activity relationships of pregabalin and analogues that target the alpha(2)-delta protein. **J Med Chem**, v. 48, n. 7, p. 2294-307. 2005.

BERTOLI, E.; DE LEEUW, R. Prevalence of Suicidal Ideation, Depression, and Anxiety in Chronic Temporomandibular Disorder Patients. **J Oral Facial Pain Headache**, v. 30, n. 4, p. 296-301. 2016.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, v. 361, n. 6407, p. 31-9. 1993.

BLISS, T. V.; COLLINGRIDGE, G. L. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. **Mol Brain**, v. 6, p. 5. 2013.

BONICA, J. J. **The management of pain**. 2nd. Philadelphia: Lea &Febiger, 1990. ISBN 0812111222.

BREITBART, W. Identifying patients at risk for, and treatment of major psychiatric complications of cancer. **Support Care Cancer**, v. 3, n. 1, p. 45-60. 1995.

BRIGATTE, P.; SAMPAIO, S. C.; GUTIERREZ, V. P.; GUERRA, J. L.; SINHORINI, I. L.; CURI, R.; CURY, Y. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J Pain**, v. 8, n. 5, p. 412-21. 2007.

BUSHNELL, M. C.; CEKO, M.; LOW, L. A. Cognitive and emotional control of pain and its disruption in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 7, p. 502-11. 2013.

CALANDRE, E. P.; GARCIA-LEIVA, J. M.; RICO-VILLADEMOROS, F.; VILCHEZ, J. S.; RODRIGUEZ-LOPEZ, C. M. Pregabalin in the treatment of chronic migraine: an open-label study. **Clin Neuropharmacol**. v. 33, n. 1, p. 35-9, 2010.

CALHOON, G. G.; TYE, K. M. Resolving the neural circuits of anxiety. **Nat Neurosci**, v. 18, n. 10, p. 1394-404. 2015.

CAMPANA, I. G.; GOIATO, M. C. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, Fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **Revista Odontológica de Araçatuba**, v. 34, n. 1, p. 20-26. 2013.

CAO, Y.; WANG, H.; CHIANG, C. Y.; DOSTROVSKY, J. O.; SESSLE, B. J. Pregabalin suppresses nociceptive behavior and central sensitization in a rat trigeminal neuropathic pain model. **J Pain**, v. 14, n. 2, p. 193-204. 2013.

CHATURVEDI, A. K.; ENGELS, E. A.; PFEIFFER, R. M.; HERNANDEZ, B. Y.; XIAO, W.; KIM, E.; JIANG, B.; GOODMAN, M. T.; SIBUG-SABER, M.; COZEN, W.; LIU, L.; LYNCH, C. F.; WENTZENSEN, N.; JORDAN, R. C.; ALTEKRUSE, S.; ANDERSON, W. F.; ROSENBERG, P. S.; GILLISON, M. L. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 32, p. 4294-301. 2011.

CHICHORRO, J. G.; PORRECA, F.; SESSLE, B. Mechanisms of craniofacial pain. **Cephalalgia**, p. 333102417704187. 2017.

CHICHORRO, J. G.; ZAMPRONIO, A. R.; RAE, G. A. Endothelin ET(B) receptor antagonist reduces mechanical allodynia in rats with trigeminal neuropathic pain. **Exp Biol Med (Maywood)**, v. 231, n. 6, p. 1136-40. 2006.

CRASKE, M. G.; STEIN, M. B.; ELEY, T. C.; MILAD, M. R.; HOLMES, A.; RAPEE, R. M.; WITTCHEN, H. U. Anxiety disorders. **Nat Rev Dis Primers**, v. 3, p. 17024. 2017.

CRAWLEY, J.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior model for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav**, v.

13, n. 2, p. 167-70. 1980.

DATTA, S.; PAI, U. T. Interventional approaches to management of pain of oral cancer. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v. 18, n. 4, p. 627-41. 2006.

DAVIS, M.; WALKER, D. L.; MILES, L.; GRILLON, C. Phasic vs sustained fear in rats and humans: role of the extended amygdala in fear vs anxiety. **Neuropsychopharmacology**, v. 35, n. 1, p. 105-35. 2010.

DE FELICE, M.; EYDE, N.; DODICK, D.; DUSSOR, G. O.; OSSIPOV, M. H.; FIELDS, H. L.; PORRECA, F. Capturing the aversive state of cephalic pain preclinically. **Ann Neurol**, v. 74, n. 2, p. 257-65. 2013.

DEROGATIS, L. R.; MORROW, G. R.; FETTING, J.; PENMAN, D.; PIASETSKY, S.; SCHMALE, A. M.; HENRICHS, M.; CARNICKE, C. L., JR. The prevalence of psychiatric disorders among cancer patients. **JAMA**, v. 249, n. 6, p. 751-7. 1983.

DESEURE, K.; HANS, G. H. Differential drug effects on spontaneous and evoked pain behavior in a model of trigeminal neuropathic pain. **J Pain Res**, v. 10, p. 279-286. 2017.

DINDO, L. N.; RECOBER, A.; HADDAD, R.; CALARGE, C. A. Comorbidity of Migraine, Major Depressive Disorder, and Generalized Anxiety Disorder in Adolescents and Young Adults. **Int J Behav Med**. 2016.

DIXIT, R.; WEISSFELD, J. L.; WILSON, D. O.; BALOGH, P.; SUFKA, P.; SIEGFRIED, J. M.; GRANDIS, J. R.; DIERGAARDE, B. Incidence of head and neck squamous cell carcinoma among subjects at high risk of lung cancer: results from the Pittsburgh Lung Screening Study. **Cancer**, v. 121, n. 9, p. 1431-5. 2015.

DOLPHIN, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. **Br J Pharmacol**. v. 147(Suppl 1), p. S56-S62, 2006.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J**

Clin Invest, v. 120, n. 11, p. 3760-72. 2010.

DWORKIN, R. H.; O'CONNOR, A. B.; BACKONJA, M.; FARRAR, J. T.; FINNERUP, N. B.; JENSEN, T. S.; KALSO, E. A.; LOESER, J. D.; MIASKOWSKI, C.; NURMIKKO, T. J.; PORTENOY, R. K.; RICE, A. S.; STACEY, B. R.; TREEDE, R. D.; TURK, D. C.; WALLACE, M. S. Pharmacologic management of neuropathic pain: evidence-based recommendations. **Pain**. v. 132, n. 3, p. 237-51, 2007.

EISENBERG, E.; MARINANGELI, F.; BIRKHAHN, J.; PALADINI, A.; VARRASI, G. **Time to modify the WHO analgesic ladder?** Pain: Clinical Update. 2005

ESIN, E.; YALCIN, S. Neuropathic cancer pain: What we are dealing with? How to manage it? **Onco Targets Ther**, v. 7, p. 599-618. 2014.

FALLON, M. T. Neuropathic pain in cancer. **Br J Anaesth**, v. 111, n. 1, p. 105-11. 2013.

FELIX-ORTIZ, A. C.; BEYELER, A.; SEO, C.; LEPLA, C. A.; WILDES, C. P.; TYE, K. M. BLA to vHPC inputs modulate anxiety-related behaviors. **Neuron**, v. 79, n. 4, p. 658-64. 2013.

FELTNER, D. E.; LIU-DUMAW, M.; SCHWEIZER, E.; BIELSKI, R. Efficacy of pregabalin in generalized social anxiety disorder: results of a double-blind, placebo-controlled, fixed-dose study. **Int Clin Psychopharmacol**, v. 26, n. 4, p. 213-20. 2011.

FIELD, M. J.; OLES, R. J.; SINGH, L. Pregabalin may represent a novel class of anxiolytic agents with a broad spectrum of activity. **Br J Pharmacol**, v. 132, n. 1, p. 1-4. 2001.

FINNERUP, N. B.; ATTAL, N.; HAROUTOUNIAN, S.; MCNICOL, E.; BARON, R.; DWORKIN, R. H.; GILRON, I.; HAANPAA, M.; HANSSON, P.; JENSEN, T. S.; KAMERMAN, P. R.; LUND, K.; MOORE, A.; RAJA, S. N.; RICE, A. S.; ROWBOTHAM, M.; SENA, E.; SIDDALL, P.; SMITH, B. H.; WALLACE, M. Pharmacotherapy for neuropathic pain in adults: a systematic review and meta-

analysis. **Lancet Neurol**, v. 14, n. 2, p. 162-73. 2015.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, n. 3, p. 573-81. 2010.

Food and Drug Administration, 2004. Disponível em: <<https://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/daf/index.cfm?event=overview.process&ApplNo=021446>>. Acesso em: 04 de Maio.

FRAMPTON, J. E. Pregabalin: a review of its use in adults with generalized anxiety disorder. **CNS Drugs**, v. 28, n. 9, p. 835-54. 2014.

FRAMPTON, J. E.; FOSTER, R. H. Pregabalin: in the treatment of generalised anxiety disorder. **CNS Drugs**, v. 20, n. 8, p. 685-93; discussion 694-5. 2006.

FUCHS, P. N.; MCNABB, C. T. The place escape/avoidance paradigm: a novel method to assess nociceptive processing. **J Integr Neurosci**, v. 11, n. 1, p. 61-72. 2012.

GALAN-ARRIERO, I.; AVILA-MARTIN, G.; FERRER-DONATO, A.; GOMEZ-SORIANO, J.; BRAVO-ESTEBAN, E.; TAYLOR, J. Oral administration of the p38alpha MAPK inhibitor, UR13870, inhibits affective pain behavior after spinal cord injury. **Pain**, v. 155, n. 10, p. 2188-98. 2014.

GALAN-ARRIERO, I.; AVILA-MARTIN, G.; FERRER-DONATO, A.; GOMEZ-SORIANO, J.; PIAZZA, S.; TAYLOR, J. Early treatment with UR13870, a novel inhibitor of p38alpha mitogen-activated protein kinase, prevents hyperreflexia and anxiety behaviors, in the spared nerve injury model of neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 604, p. 69-74. 2015.

GAMBETA, E.; KOPRUSZINSKI, C. M.; DOS REIS, R. C.; ZANOVELI, J. M.; CHICHORRO, J. G. Evaluation of heat hyperalgesia and anxiety-like behaviors in a rat model of orofacial cancer. **Neurosci Lett**, v. 619, p. 100-5. 2016.

GARCIA-BORREGUERO, D.; LARROSA, O.; WILLIAMS, A. M.; ALBARES, J.; PASCUAL, M.; PALACIOS, J. C.; FERNANDEZ, C. Treatment of restless legs syndrome with pregabalin: a double-blind, placebo-controlled study. **Neurology**.v. 74, n. 23, p. 1897-904, 2010.

GEUZE, E.; WESTENBERG, H. G.; JOCHIMS, A.; DE KLOET, C. S.; BOHUS, M.; VERMETTEN, E.; SCHMAHL, C. Altered pain processing in veterans with posttraumatic stress disorder. **Arch Gen Psychiatry**, v. 64, n. 1, p. 76-85. 2007.

GONCALVES, L.; DICKENSON, A. H. Asymmetric time-dependent activation of right central amygdala neurones in rats with peripheral neuropathy and pregabalin modulation. **Eur J Neurosci**, v. 36, n. 9, p. 3204-13. 2012.

GREER, J. A.; PARK, E. R.; PRIGERSON, H. G.; SAFREN, S. A. Tailoring Cognitive-Behavioral Therapy to Treat Anxiety Comorbid with Advanced Cancer. **J Cogn Psychother**, v. 24, n. 4, p. 294-313. 2010.

GRUPE, D. W.; NITSCHKE, J. B. Uncertainty and anticipation in anxiety: an integrated neurobiological and psychological perspective. **Nat Rev Neurosci**, v. 14, n. 7, p. 488-501. 2013.

HARANO, N.; ONO, K.; HIDAKA, K.; KAI, A.; NAKANISHI, O.; INENAGA, K. Differences between orofacial inflammation and cancer pain. **J Dent Res**, v. 89, n. 6, p. 615-20. 2010.

HARTE, S. E.; MEYERS, J. B.; DONAHUE, R. R.; TAYLOR, B. K.; MORROW, T. J. Mechanical Conflict System: A Novel Operant Method for the Assessment of Nociceptive Behavior. **PLoS One**, v. 11, n. 2, p. e0150164. 2016.

HASHIBE, M.; BRENNAN, P.; CHUANG, S. C.; BOCCIA, S.; CASTELLSAGUE, X.; CHEN, C.; CURADO, M. P.; DAL MASO, L.; DAUDT, A. W.; FABIANOVA, E.; FERNANDEZ, L.; WUNSCH-FILHO, V.; FRANCESCHI, S.; HAYES, R. B.; HERRERO, R.; KELSEY, K.; KOIFMAN, S.; LA VECCHIA, C.; LAZARUS, P.; LEVI, F.; LENCE, J. J.; MATES, D.; MATOS, E.; MENEZES, A.; MCCLEAN, M. D.;

MUSCAT, J.; ELUF-NETO, J.; OLSHAN, A. F.; PURDUE, M.; RUDNAI, P.; SCHWARTZ, S. M.; SMITH, E.; STURGIS, E. M.; SZESZENIA-DABROWSKA, N.; TALAMINI, R.; WEI, Q.; WINN, D. M.; SHANGINA, O.; PILARSKA, A.; ZHANG, Z. F.; FERRO, G.; BERTHILLER, J.; BOFFETTA, P. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 2, p. 541-50. 2009.

HASNIE, F. S.; BREUER, J.; PARKER, S.; WALLACE, V.; BLACKBEARD, J.; LEVER, I.; KINCHINGTON, P. R.; DICKENSON, A. H.; PHEBY, T.; RICE, A. S. Further characterization of a rat model of varicella zoster virus-associated pain: Relationship between mechanical hypersensitivity and anxiety-related behavior, and the influence of analgesic drugs. **Neuroscience**, v. 144, n. 4, p. 1495-508. 2007.

HEGARTY, A.; PORTENOY, R. K. Pharmacotherapy of neuropathic pain. **Semin Neurol**, v. 14, n. 3, p. 213-24, 1994.

HIDAKA, K.; ONO, K.; HARANO, N.; SAGO, T.; NUNOMAKI, M.; SHIIBA, S.; NAKANISHI, O.; FUKUSHIMA, H.; INENAGA, K. Central glial activation mediates cancer-induced pain in a rat facial cancer model. **Neuroscience**, v. 180, p. 334-43. 2011.

HINDMARCH, I.; DAWSON, J.; STANLEY, N. A double-blind study in healthy volunteers to assess the effects on sleep of pregabalin compared with alprazolam and placebo. **Sleep**, v. 28, n. 2, p. 187-93, 2005.

HSIEH, J. C.; STONE-ELANDER, S.; INGVAR, M. Anticipatory coping of pain expressed in the human anterior cingulate cortex: a positron emission tomography study. **Neurosci Lett**, v. 262, n. 1, p. 61-4. 1999.

HUMMIG, W.; KOPRUSZINSKI, C. M.; CHICHORRO, J. G. Pregabalin reduces acute inflammatory and persistent pain associated with nerve injury and cancer in rat models of orofacial pain. **J Oral Facial Pain Headache**, v. 28, n. 4, p. 350-9. 2014.

Instituto Nacional de Câncer, 2012, Disponível em: http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/diagnostic_o. Acesso em: 03 de Maio de 2017.

Instituto Nacional de Câncer, 2016, Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao>. Acesso em: 06 de Maio de 2017.

JAVED, S.; PETROPOULOS, I. N.; ALAM, U.; MALIK, R. A. Treatment of painful diabetic neuropathy. **Ther Adv Chronic Dis**, v. 6, n. 1, p. 15-28. 2015.

KANG, S. J.; LIU, M. G.; SHI, T. Y.; ZHAO, M. G.; KAANG, B. K.; ZHUO, M. N-type voltage gated calcium channels mediate excitatory synaptic transmission in the anterior cingulate cortex of adult mice. **Mol Pain**, v. 9, p. 58. 2013.

KARATAS, O. F.; ONER, M.; ABAY, A.; DIYAPOGLU, A. MicroRNAs in human tongue squamous cell carcinoma: From pathogenesis to therapeutic implications. **Oral Oncol**, v. 67, p. 124-130. 2017.

KAVOUSSI, R. Pregabalin: From molecule to medicine. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 16 Suppl 2, p. S128-33. 2006.

KESSLER, R. C. The global burden of anxiety and mood disorders: putting the European Study of the Epidemiology of Mental Disorders (ESEMeD) findings into perspective. **J Clin Psychiatry**, v. 68 Suppl 2, p. 10-9. 2007.

KING, T.; VERA-PORTOCARRERO, L.; GUTIERREZ, T.; VANDERAH, T. W.; DUSSOR, G.; LAI, J.; FIELDS, H. L.; PORRECA, F. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. **Nat Neurosci**, v. 12, n. 11, p. 1364-6. 2009.

KITCHENER, J. M. Glossopharyngeal neuralgia responding to pregabalin. **Headache**, v. 46, n. 8, p. 1307-8, 2006.

KOGA, K.; DESCALZI, G.; CHEN, T.; KO, H. G.; LU, J.; LI, S.; SON, J.; KIM, T.;

KWAK, C.; HUGANIR, R. L.; ZHAO, M. G.; KAANG, B. K.; COLLINGRIDGE, G. L.; ZHUO, M. Coexistence of two forms of LTP in ACC provides a synaptic mechanism for the interactions between anxiety and chronic pain. **Neuron**, v. 85, n. 2, p. 377-89. 2015.

KOPRUSZINSKI, C. M. **Estudo do desenvolvimento de alterações sensoriais e avaliação da participação do sistema endotelinérgico em um modelo experimental de carcinoma facial**. 2016. Farmacologia, Universidade Federal do Paraná.

KREMER, M.; SALVAT, E.; MULLER, A.; YALCIN, I.; BARROT, M. Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights. **Neuroscience**, v. 338, p. 183-206. 2016.

KUMAR, N.; CHERKAS, P. S.; VARATHAN, V.; MIYAMOTO, M.; CHIANG, C. Y.; DOSTROVSKY, J. O.; SESSLE, B. J.; CODERRE, T. J. Systemic pregabalin attenuates facial hypersensitivity and noxious stimulus-evoked release of glutamate in medullary dorsal horn in a rodent model of trigeminal neuropathic pain. **NeurochemInt**, v. 62, n. 6, p. 831-5. 2013.

KUTAY, O.; AKDAL, G.; KESKINOGLU, P.; BALCI, B. D.; ALKIN, T. Vestibular migraine patients are more anxious than migraine patients without vestibular symptoms. **J Neurol**. 2017.

LA PORTA, C.; LARA-MAYORGA, I. M.; NEGRETE, R.; MALDONADO, R. Effects of pregabalin on the nociceptive, emotional and cognitive manifestations of neuropathic pain in mice. **Eur J Pain**, v. 20, n. 9, p. 1454-66. 2016.

LAM, D. K.; SCHMIDT, B. L. Orofacial pain onset predicts transition to head and neck cancer. **Pain**, v. 152, n. 5, p. 1206-9. 2011.

LAMPIC, C.; THURFJELL, E.; BERGH, J.; SJODEN, P. O. Short- and long-term anxiety and depression in women recalled after breast cancer screening. **Eur J Cancer**, v. 37, n. 4, p. 463-9. 2001.

LAU, W.; DYKSTRA, C.; THEVARKUNNEL, S.; SILENIEKS, L. B.; DE LANNOY, I. A.; LEE, D. K.; HIGGINS, G. A. A back translation of pregabalin and carbamazepine against evoked and non-evoked endpoints in the rat spared nerve injury model of neuropathic pain. **Neuropharmacology**, v. 73, p. 204-15. 2013.

LI, Z.; TAYLOR, C. P.; WEBER, M.; PIECHAN, J.; PRIOR, F.; BIAN, F.; CUI, M.; HOFFMAN, D.; DONEVAN, S. Pregabalin is a potent and selective ligand for $\alpha(2)\delta$ -1 and $\alpha(2)\delta$ -2 calcium channel subunits. **Eur J Pharmacol.** v. 667, n. 1-3, p. 80-90, 2011.

LOTARSKI, S. M.; DONEVAN, S.; EL-KATTAN, A.; OSGOOD, S.; POE, J.; TAYLOR, C. P.; OFFORD, J. Anxiolytic-like activity of pregabalin in the Vogel conflict test in α 2delta-1 (R217A) and α 2delta-2 (R279A) mouse mutants. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 338, n. 2, p. 615-21. 2011.

MACIANSKYTE, D.; JANUZIS, G.; KUBILIUS, R.; ADOMAITIENE, V.; SCIUPOKAS, A. Associations between chronic pain and depressive symptoms in patients with trigeminal neuralgia. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 7, p. 386-92. 2011.

MANTYH, P. W. Cancer pain and its impact on diagnosis, survival and quality of life. **Nat Rev Neurosci**, v. 7, n. 10, p. 797-809. 2006.

MANTYH, W. G.; JIMENEZ-ANDRADE, J. M.; STAKE, J. I.; BLOOM, A. P.; KACZMARSKA, M. J.; TAYLOR, R. N.; FREEMAN, K. T.; GHILARDI, J. R.; KUSKOWSKI, M. A.; MANTYH, P. W. Blockade of nerve sprouting and neuroma formation markedly attenuates the development of late stage cancer pain. **Neuroscience**, v. 171, n. 2, p. 588-98. 2010.

MASSIE, M. J.; HOLLAND, J. C. Overview of normal reactions and prevalence of psychiatric disorders. In: HOLLAND, J. C. e ROWLAND, J. H. (Ed.). **Handbook of Psychooncology: Psychological Care of the Patient With Cancer**. New York: Oxford University Press, 1989.

MASSIE, M. J.; HOLLAND, J. C. The cancer patient with pain: psychiatric complications and their management. **J Pain Symptom Manage**, v. 7, n. 2, p. 99-109. 1992.

MEHNERT, A.; KOCH, U. Prevalence of acute and post-traumatic stress disorder and comorbid mental disorders in breast cancer patients during primary cancer care: a prospective study. **Psychooncology**, v. 16, n. 3, p. 181-8. 2007.

MELO FILHO, M. R.; ROCHA, B. A.; PIRES, M. B. O.; FONSECA, E. S.; DE FREITAS, E. M.; MARTELLI JR., H.; SANTOS, F. B. G. Quality of life of patients with head and neck cancer. **Braz J Otorhinolaryngol.**,v. 79, n. 1, p. 82-88. 2013.

MERCADANTE, S. Cancer pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 7, n. 2, p. 139-43. 2013.

MERCADANTE, S. Breakthrough pain in cancer patients: prevalence, mechanisms and treatment options. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 28, n. 5, p. 559-64. 2015.

MERCADANTE, S.; PORTENOY, R. K. Opioid poorly-responsive cancer pain. Part 1: clinical considerations. **J Pain Symptom Manage**. v. 21, n. 2, p. 144-50, 2001.

MICO, J. A.; PRIETO, R. Elucidating the mechanism of action of pregabalin: alpha(2)delta as a therapeutic target in anxiety. **CNS Drugs**, v. 26, n. 8, p. 637-48. 2012.

MILLER, K.; MASSIE, M. J. Depression and anxiety. **Cancer J**, v. 12, n. 5, p. 388-97. 2006.

MITRA, R.; JONES, S. Adjuvant analgesics in cancer pain: a review. **Am J Hosp Palliat Care**. v. 29, n. 1, p. 70-9, 2012.

MONTGOMERY, S.; EMIR, B.; HASWELL, H.; PRIETO, R. Long-term treatment of anxiety disorders with pregabalin: a 1 year open-label study of safety and tolerability. **Curr Med Res Opin**, v. 29, n. 10, p. 1223-30. 2013.

MONTGOMERY, S. A.; KASPER, S. Pharmacotherapy update: pregabalin in the treatment of generalized anxiety disorder. **Clin Med Insights Ther**. 2, p. 189-202, 2010.

MURAI, N.; SEKIZAWA, T.; GOTOH, T.; WATABIKI, T.; TAKAHASHI, M.; KAKIMOTO, S.; TAKAHASHI, Y.; IINO, M.; NAGAKURA, Y. Spontaneous and evoked pain-associated behaviors in a rat model of neuropathic pain respond differently to drugs with different mechanisms of action. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 141, p. 10-7. 2016.

NAGAKURA, Y.; OE, T.; AOKI, T.; MATSUOKA, N. Biogenic amine depletion causes chronic muscular pain and tactile allodynia accompanied by depression: A putative animal model of fibromyalgia. **Pain**, v. 146, n. 1-2, p. 26-33. 2009.

NARITA, N.; KUMAR, N.; CHERKAS, P. S.; CHIANG, C. Y.; DOSTROVSKY, J. O.; CODERRE, T. J.; SESSLE, B. J. Systemic pregabalin attenuates sensorimotor responses and medullary glutamate release in inflammatory tooth pain model. **Neuroscience**, v. 218, p. 359-66. 2012.

NAVARRO, A.; SALDANA, M. T.; PEREZ, C.; TORRADES, S.; REJAS, J. Patient-reported outcomes in subjects with neuropathic pain receiving pregabalin: evidence from medical practice in primary care settings. **Pain Med**, v. 11, n. 5, p. 719-31. 2010.

NAVRATILOVA, E.; ATCHERLEY, C. W.; PORRECA, F. Brain Circuits Encoding Reward from Pain Relief. **Trends Neurosci**, v. 38, n. 11, p. 741-50. 2015.

NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; KING, T.; PORRECA, F. Evaluation of reward from pain relief. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1282, p. 1-11. 2013.

National Cancer Institute, 2013, Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet>>. Acesso em: 03 de Maio de 2017.

NEUGEBAUER, V. Amygdala pain mechanisms. **Handb Exp Pharmacol**, v. 227, p. 261-84. 2015.

NIKBAKHSH, N.; MOUDI, S.; ABBASIAN, S.; KHAFRI, S. Prevalence of depression and anxiety among cancer patients. **Caspian J Intern Med**, v. 5, n. 3, p. 167-70. 2014.

NIN, M. S.; COUTO-PEREIRA, N. S.; SOUZA, M. F.; AZEREDO, L. A.; FERRI, M. K.; DALPRA, W. L.; GOMEZ, R.; BARROS, H. M. Anxiolytic effect of clonazepam in female rats: grooming microstructure and elevated plus maze tests. **Eur J Pharmacol**, v. 684, n. 1-3, p. 95-101. 2012.

NONES, C. F.; CLAUDINO, R. F.; FERREIRA, L. E.; DOS REIS, R. C.; KING, T.; CHICHORRO, J. G. Descending facilitatory pain pathways mediate ongoing pain and tactile hypersensitivity in a rat model of trigeminal neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 644, p. 18-23. 2017.

NONES, C. F.; REIS, R. C.; JESUS, C. H.; VERONEZ, D. A.; CUNHA, J. M.; CHICHORRO, J. G. Orofacial sensory changes after streptozotocin-induced diabetes in rats. **Brain Res**, v. 1501, p. 56-67. 2013.

NORDIN, K.; BERGLUND, G.; GLIMELIUS, B.; SJODEN, P. O. Predicting anxiety and depression among cancer patients: a clinical model. **Eur J Cancer**, v. 37, n. 3, p. 376-84. 2001.

O'NEIL, M. F.; MOORE, N. A. Animal models of depression: are there any? **Hum Psychopharmacol**, v. 18, n. 4, p. 239-54. 2003.

OBERMANN, M.; YOON, M. S.; SENSEN, K.; MASCHKE, M.; DIENER, H. C.; KATSARAVA, Z. Efficacy of pregabalin in the treatment of trigeminal neuralgia. **Cephalalgia**, v. 28, n. 2, p. 174-81, 2008.

OKUN, A.; DEFELICE, M.; EYDE, N.; REN, J.; MERCADO, R.; KING, T.; PORRECA, F. Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive

afferents. **Mol Pain**, v. 7, p. 4. 2011.

ONO, K.; HARANO, N.; NAGAHATA, S.; SETA, Y.; TSUJISAWA, T.; INENAGA, K.; NAKANISHI, O. Behavioral characteristics and c-Fos expression in the medullary dorsal horn in a rat model for orofacial cancer pain. **Eur J Pain**, v. 13, n. 4, p. 373-9. 2009.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**, v. 120, n. 11, p. 3779-87. 2010.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, n. 2, p. 143-51. 2014.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **J Neurosci Methods**, v. 14, n. 3, p. 149-67. 1985.

PERES, M. F. P.; MERCANTE, J. P. P.; TOBO, P. R.; KAMEI, H.; BIGAL, M. E. Anxiety and depression symptoms and migraine: a symptom-based approach research. **J Headache Pain**, v. 18, n. 1, p. 37. 2017.

PEREZ, C.; NAVARRO, A.; SALDANA, M. T.; MARTINEZ, S.; REJAS, J. Patient-reported outcomes in subjects with painful trigeminal neuralgia receiving pregabalin: evidence from medical practice in primary care settings. **Cephalalgia**, v. 29, n. 7, p. 781-90. 2009.

PERTOVAARA, A. Noradrenergic pain modulation. **Prog Neurobiol**, v. 80, n. 2, p. 53-83. 2006.

PICKERING, V.; JAY GUPTA, R.; QUANG, P.; JORDAN, R. C.; SCHMIDT, B. L. Effect of peripheral endothelin-1 concentration on carcinoma-induced pain in mice. **Eur J Pain**, v. 12, n. 3, p. 293-300. 2008.

PLOGHAUS, A.; TRACEY, I.; GATI, J. S.; CLARE, S.; MENON, R. S.; MATTHEWS,

P. M.; RAWLINS, J. N. Dissociating pain from its anticipation in the human brain. **Science**, v. 284, n. 5422, p. 1979-81. 1999.

PORTENOY, K. K.; FOLEY, K. M.; INTURISSI, C. E. The nature of opioid responsiveness and its implications for neuropathic pain: new hypotheses derived from studies of opioid infusions. **Pain**, v. 43, p. 273-86, 1990.

QU, C.; KING, T.; OKUN, A.; LAI, J.; FIELDS, H. L.; PORRECA, F. Lesion of the rostral anterior cingulate cortex eliminates the aversiveness of spontaneous neuropathic pain following partial or complete axotomy. **Pain**, v. 152, n. 7, p. 1641-8. 2011.

RAFFA, R. B.; PERGOLIZZI, J. V., JR. A modern analgesics pain 'pyramid'. **J Clin Pharm Ther**, v. 39, n. 1, p. 4-6. 2014.

RAMAN, S.; DEANGELIS, C.; BRUERA, E.; CHOW, R.; LECHNER, B.; CHOW, E. Does Pregabalin Still Have a Role in Treating Cancer-Induced Bone Pain? **J Clin Oncol**, v. 34, n. 6, p. 524-6. 2016.

RAMOS, A. Animal models of anxiety: do I need multiple tests? **Trends Pharmacol Sci**, v. 29, n. 10, p. 493-8. 2008.

RAOOF, M.; EBRAHIMNEJAD, H.; ABBASNEJAD, M.; AMIRKHOSRAVI, L.; RAOOF, R.; ESMAEILI MAHANI, S.; RAMAZANI, M.; SHOKOUHINEJAD, N.; KHOSHKHOUNEJAD, M. The Effects of Inflammatory Tooth Pain on Anxiety in Adult Male Rats. **Basic Clin Neurosci**, v. 7, n. 3, p. 259-68. 2016.

REMENIUK, B.; SUKHTANKAR, D.; OKUN, A.; NAVRATILOVA, E.; XIE, J. Y.; KING, T.; PORRECA, F. Behavioral and neurochemical analysis of ongoing bone cancer pain in rats. **Pain**, v. 156, n. 10, p. 1864-73. 2015.

REZENDE, T. M.; DE SOUZA FREIRE, M.; FRANCO, O. L. Head and neck cancer: proteomic advances and biomarker achievements. **Cancer**, v. 116, n. 21, p. 4914-25. 2010.

ROESKA, K.; DOODS, H.; ARNDT, K.; TREEDE, R. D.; CECI, A. Anxiety-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the analgesic drugs morphine and gabapentin. **Pain**, v. 139, n. 2, p. 349-57. 2008.

RUTTEN, K.; DE VRY, J.; ROBENS, A.; TZSCHENTKE, T. M.; VAN DER KAM, E. L. Dissociation of rewarding, anti-aversive and anti-nociceptive effects of different classes of anti-nociceptives in the rat. **Eur J Pain**, v. 15, n. 3, p. 299-305. 2011.

SACHS, B. D. The development of grooming and its expression in adult animals. **Ann N Y Acad Sci**, v. 525, p. 1-17. 1988.

SCHMIDT, B. L. The neurobiology of cancer pain. **Neuroscientist**, v. 20, n. 5, p. 546-62. 2014.

SCHMIDT, B. L. The Neurobiology of Cancer Pain. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 73, n. 12 Suppl, p. S132-5. 2015.

SCHMIDT, B. L.; PICKERING, V.; LIU, S.; QUANG, P.; DOLAN, J.; CONNELLY, S. T.; JORDAN, R. C. Peripheral endothelin A receptor antagonism attenuates carcinoma-induced pain. **Eur J Pain**, v. 11, n. 4, p. 406-14. 2007.

SEMINOWICZ, D. A.; LAFERRIERE, A. L.; MILLECAMP, M.; YU, J. S.; CODERRE, T. J.; BUSHNELL, M. C. MRI structural brain changes associated with sensory and emotional function in a rat model of long-term neuropathic pain. **Neuroimage**, v. 47, n. 3, p. 1007-14. 2009.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiol**, v. 71, n. 4, p. 117-36. 2005.

SESSLE, B. J. Mechanisms of oral somatosensory and motor functions and their clinical correlates. **J Oral Rehabil**, v. 33, n. 4, p. 243-61. 2006.

SHANG, L.; XU, T. L.; LI, F.; SU, J.; LI, W. G. Temporal dynamics of anxiety

phenotypes in a dental pulp injury model. **Mol Pain**, v. 11, p. 40. 2015.

SHENOY, P. A.; KUO, A.; VETTER, I.; SMITH, M. T. The Walker 256 Breast Cancer Cell- Induced Bone Pain Model in Rats. **Front Pharmacol.**v. 7, p. 286, 2016.

SONIS, S.T. Oral mucositis in head and neck cancer: risk, biology, and management. **Am Soc Clin Oncol Educ Book**. 2013.

STAHL, S. M.; PORRECA, F.; TAYLOR, C. P.; CHEUNG, R.; THORPE, A. J.; CLAIR, A. The diverse therapeutic actions of pregabalin: is a single mechanism responsible for several pharmacological activities? **Trends Pharmacol Sci**, v. 34, n. 6, p. 332-9. 2013.

STEINMAN, R. H. **The Cancer Patient with Anxiety and Chronic Pain**. Pain: Clinical Updates. 2009

TESFAYE, S.; VILEIKYTE, L.; RAYMAN, G.; SINDRUP, S. H.; PERKINS, B. A.; BACONJA, M.; VINIK, A. I.; BOULTON, A. J.; TORONTO EXPERT PANEL ON DIABETIC, N. Painful diabetic peripheral neuropathy: consensus recommendations on diagnosis, assessment and management. **Diabetes Metab Res Rev**, v. 27, n. 7, p. 629-38. 2011.

TICKOO, R. S.; KEY, R. G.; BREITBART, W. S. Cancer-related pain. In: HOLLAND, J. C.;BREITBART, W. S., *et al* (Ed.). **Psycho-oncology**. New York: Oxford University Press, 2015.

TOVOTE, P.; FADOK, J. P.; LUTHI, A. Neuronal circuits for fear and anxiety. **Nat Rev Neurosci**, v. 16, n. 6, p. 317-31. 2015.

TRAEGER, L.; GREER, J. A.; FERNANDEZ-ROBLES, C.; TEMEL, J. S.; PIRL, W. F. Evidence-based treatment of anxiety in patients with cancer. **J Clin Oncol**, v. 30, n. 11, p. 1197-205. 2012.

TUCHMAN, M.; BARRETT, J. A.; DONEVAN, S.; HEDBERG, T. G.; TAYLOR, C. P.

Central sensitization and Ca(V) α (2) δ ligands in chronic pain syndromes: pathologic processes and pharmacologic effect. **J Pain**, v. 11, n. 12, p. 1241-9. 2010.

TYE, K. M.; PRAKASH, R.; KIM, S. Y.; FENNO, L. E.; GROSENICK, L.; ZARABI, H.; THOMPSON, K. R.; GRADINARU, V.; RAMAKRISHNAN, C.; DEISSEROTH, K. Amygdala circuitry mediating reversible and bidirectional control of anxiety. **Nature**, v. 471, n. 7338, p. 358-62. 2011.

UNAL, D.; ORHAN, O.; OZSOY, S. D.; BESIRLI, A.; EROGLU, C.; KAPLAN, B. Effect of radiotherapy on psychiatric disorder in patients with head and neck cancer. **Indian J Cancer**, v. 53, n. 1, p. 162-5. 2016.

VAN'T SPIJKER, A.; TRIJSBURG, R. W.; DUIVENVOORDEN, H. J. Psychological sequelae of cancer diagnosis: a meta-analytical review of 58 studies after 1980. **Psychosom Med**, v. 59, n. 3, p. 280-93. 1997.

VAN DEN BEUKEN-VAN EVERDINGEN, M. H.; DE GRAEFF, A.; JONGEN, J. L.; DIJKSTRA, D.; MOSTOVAYA, I.; VISSERS, K. C.; NATIONAL GUIDELINE WORKING GROUP "DIAGNOSIS TREATMENT OF CANCER PAIN". Pharmacological Treatment of Pain in Cancer Patients: The Role of Adjuvant Analgesics, a Systematic Review. **Pain Pract.** v. 17, n. 3, p. 409-419, 2017.

VAN MIDDENDORP, H.; LUMLEY, M. A.; JACOBS, J. W.; BIJLSMA, J. W.; GEENEN, R. The effects of anger and sadness on clinical pain reports and experimentally-induced pain thresholds in women with and without fibromyalgia. **Arthritis Care Res (Hoboken)**, v. 62, n. 10, p. 1370-6. 2010.

VARGAS-SCHAFFER, G. Is the WHO analgesic ladder still valid? Twenty-four years of experience. **Can Fam Physician**, v. 56, n. 6, p. 514-7, e202-5. 2010.

VIET, C. T.; CORBY, P. M.; AKINWANDE, A.; SCHMIDT, B. L. Review of preclinical studies on treatment of mucositis and associated pain. **J Dent Res.** v. 93, n. 9, p. 868-75, 2014.

VIET, C. T.; SCHMIDT, B. L. Biologic mechanisms of oral cancer pain and implications for clinical therapy. **J Dent Res**, v. 91, n. 5, p. 447-53. 2012.

VOS, B. P.; HANS, G.; ADRIAENSEN, H. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. **Pain**, v. 76, n. 1-2, p. 173-8. 1998.

WALLACE, V. C.; BLACKBEARD, J.; SEGERDAHL, A. R.; HASNIE, F.; PHEBY, T.; MCMAHON, S. B.; RICE, A. S. Characterization of rodent models of HIV-gp120 and anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Brain**, v. 130, n. Pt 10, p. 2688-702. 2007.

WALLACE, V. C.; SEGERDAHL, A. R.; BLACKBEARD, J.; PHEBY, T.; RICE, A. S. Anxiety-like behaviour is attenuated by gabapentin, morphine and diazepam in a rodent model of HIV anti-retroviral-associated neuropathic pain. **Neurosci Lett**, v. 448, n. 1, p. 153-6. 2008.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychol Bull**, v. 83, n. 3, p. 482-504. 1976.

WANG, J.; LI, Z. H.; FENG, B.; ZHANG, T.; ZHANG, H.; LI, H.; CHEN, T.; CUI, J.; ZANG, W. D.; LI, Y. Q. Corticotrigeminal Projections from the Insular Cortex to the Trigeminal Caudal Subnucleus Regulate Orofacial Pain after Nerve Injury via Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation in Insular Cortex Neurons. **Front Cell Neurosci**, v. 9, p. 493. 2015.

WANG, Z.; PANG, R. D.; HERNANDEZ, M.; OCAMPO, M. A.; HOLSCHNEIDER, D. P. Anxiolytic-like effect of pregabalin on unconditioned fear in the rat: an autoradiographic brain perfusion mapping and functional connectivity study. **Neuroimage**, v. 59, n. 4, p. 4168-88. 2012.

WHO. **Cancer pain relief : with a guide to opioid availability**. 2nd ed. Geneva : World Health Organization, 1996. ISBN 9241544821.

WIECH, K.; TRACEY, I. The influence of negative emotions on pain: behavioral effects and neural mechanisms. **Neuroimage**, v. 47, n. 3, p. 987-94. 2009.

WIFFEN, P. J.; DERRY, S.; MOORE, R. A.; ALDINGTON, D.; COLE, P.; RICE, A. S.; LUNN, M. P.; HAMUNEN, K.; HAANPAA, M.; KALSO, E. A. Antiepileptic drugs for neuropathic pain and fibromyalgia - an overview of Cochrane reviews. **Cochrane Database Syst Rev**, n. 11, p. CD010567. 2013.

WU, L. J.; ZHAO, M. G.; TOYODA, H.; KO, S. W.; ZHUO, M. Kainate receptor-mediated synaptic transmission in the adult anterior cingulate cortex. **J Neurophysiol**, v. 94, n. 3, p. 1805-13. 2005.

WU, Y. S.; LIN, P. Y.; CHIEN, C. Y.; FANG, F. M.; CHIU, N. M.; HUNG, C. F.; LEE, Y.; CHONG, M. Y. Anxiety and depression in patients with head and neck cancer: 6-month follow-up study. **Neuropsychiatr Dis Treat**, v. 12, p. 1029-36. 2016.

YE, Y.; DANG, D.; ZHANG, J.; VIET, C. T.; LAM, D. K.; DOLAN, J. C.; GIBBS, J. L.; SCHMIDT, B. L. Nerve growth factor links oral cancer progression, pain, and cachexia. **Mol Cancer Ther**, v. 10, n. 9, p. 1667-76. 2011.

YOSHINO, A.; OKAMOTO, Y.; ONODA, K.; YOSHIMURA, S.; KUNISATO, Y.; DEMOTO, Y.; OKADA, G.; YAMAWAKI, S. Sadness enhances the experience of pain via neural activation in the anterior cingulate cortex and amygdala: an fMRI study. **Neuroimage**, v. 50, n. 3, p. 1194-201. 2010.

ZAKRZEWSKA, J. M.; WU, J.; MON-WILLIAMS, M.; PHILLIPS, N.; PAVITT, S. H. Evaluating the impact of trigeminal neuralgia. **Pain**, v. 158, n. 6, p. 1166-1174. 2017.

ZAMPONI, G. W. Targeting voltage-gated calcium channels in neurological and psychiatric diseases. **Nat Rev Drug Discov**, v. 15, n. 1, p. 19-34. 2016.

ZAMPONI, G. W.; STRIESSNIG, J.; KOSCHAK, A.; DOLPHIN, A. C. The Physiology, Pathology, and Pharmacology of Voltage-Gated Calcium Channels and Their Future Therapeutic Potential. **Pharmacol Rev**, v. 67, n. 4, p. 821-70. 2015.

ZHANG, M.; LIU, Y.; ZHAO, M.; TANG, W.; WANG, X.; DONG, Z.; YU, S. Depression and anxiety behaviour in a rat model of chronic migraine. **J Headache Pain**, v. 18, n. 1, p. 27. 2017.

ZHANG, N.; CHEN, C. F.; YU, F. Y. Effects of pregabalin on central sensitization in patients with migraine. **Int J Clin Pharmacol Ther**. v. 53, n. 4, p. 277-83, 2015.

ZHANG, S. S.; WU, Z.; ZHANG, L. C.; ZHANG, Z.; CHEN, R. P.; HUANG, Y. H.; CHEN, H. Efficacy and safety of pregabalin for treating painful diabetic peripheral neuropathy: a meta-analysis. **Acta Anaesthesiol Scand**, v. 59, n. 2, p. 147-59. 2015.

ZHUO, M. Neural Mechanisms Underlying Anxiety-Chronic Pain Interactions. **Trends Neurosci**, v. 39, n. 3, p. 136-45. 2016.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, n. 2, p. 109-10. 1983.

ZOHAR, J.; MATAR, M. A.; IFERGANE, G.; KAPLAN, Z.; COHEN, H. Brief post-stressor treatment with pregabalin in an animal model for PTSD: short-term anxiolytic effects without long-term anxiogenic effect. **Eur Neuropsychopharmacol**, v. 18, n. 9, p. 653-66. 2008.